

**Vitamin D₃-Analogon / β -Cyclodextrin-Kavitate
- Herstellung, Charakterisierung und In-vitro-Liberation
aus Dermatika -**



Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

eingereicht am 25. November 1997,
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Pharmazie

von Patrick Franke
geb. am 25. Dezember 1967 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekanin Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. V. Bonacic-Koutecký

Gutachter: 1. Prof. Dr. S. Keipert
 2. Prof. Dr. K.-H. Frömming
 3. Prof. Dr. M. Gloor

Tag der mündlichen Prüfung: 17. April 1998

Abstract

The aim of the present work was to study the possibility of forming cavities of a new Vitamin D₃ analogue in native β -cyclodextrin, dimethyl- β -cyclodextrin, β -cyclodextrin-polymer, maltosyl- β -cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and carboxyethyl- β -cyclodextrin and to characterize the resulting adducts as regards their composition and properties. Furthermore, in vitro and in vivo studies will be conducted to examine the influence of the β -cyclodextrins in view to retardation effects after incorporation in ointments chosen for the treatment of psoriasis. The solid inclusions are produced with the kneading method or by co-precipitation, depending on the type of cyclodextrin. Phase-solubility diagrams will be drawn and complex stability constants calculated. The formation of associates with the cyclodextrins leads to a substantial improvement of the solubility of the drug. DSC studies are used to characterize the solid associates. The presence of β -cyclodextrins leads to a reduction of the release rate of the active substance in vitro, especially in the case of native β -cyclodextrin. A much reduced effect with regard to epidermal hyperplasia of nude mice is also demonstrable in vivo. The findings are discussed within the framework of the question of retardation and better tolerance as regards skin irritation, systemic side effects and local efficacy of the Vitamin D₃ analogue.

Key words: Vitamin D₃ analogue, β -cyclodextrin, In vitro release, In vivo studies

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung der Möglichkeit der Bildung von Einschlußverbindungen eines neuen Vitamin D₃ Analogon mit nativem β -Cyclodextrin, Dimethyl- β -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin-Polymer, Maltosyl- β -Cyclodextrin, Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin und Carboxyethyl- β -Cyclodextrin. Die resultierenden Addukte wurden im Hinblick auf Zusammensetzung und Eigenschaften charakterisiert. Weiterhin wurden in vitro und in vivo Untersuchungen durchgeführt, um den Einfluß von β -Cyclodextrinen, vor allem im Hinblick auf Retardierungseffekte, nach Einarbeitung in Salben für die Indikation Psoriasis zu interpretieren. Die Herstellung der festen Kavitate erfolgte in Abhängigkeit vom Cyclodextrin-Typ mittels Knetmethode oder Kopräzipitation. Die Assoziatbildung mit β -Cyclodextrinen in Lösung führte zu einer deutlichen Verbesserung der Löslichkeit des Vitamin D₃ Analogon. Zur Ermittlung von Löslichkeitsisothermen wurden von den Systemen Phasenlöslichkeitsdiagramme aufgenommen sowie Komplexstabilitätskonstanten berechnet. Zur Charakterisierung der festen dienten DSC-Untersuchungen. Die Anwesenheit von β -Cyclodextrinen führte zu einer Reduktion der Freisetzungsrates der aktiven Verbindung in vitro, besonders im Falle von nativem β -Cyclodextrin. Auch ein deutlich reduzierter Effekt im Hinblick auf die Epidermishyperplasie von Nacktmäusen ist in vivo demonstrierbar. Die Ergebnisse werden im Rahmen der Fragestellung eines Retardierungseffektes sowie einer besseren Hautverträglichkeit, systemischen Nebenwirkungen und lokaler Effektivität des neuen Vitamin D₃ Analogon diskutiert.

Schlagwörter: Vitamin D₃ Analogon, β -Cyclodextrin, In vitro Freisetzung, In vivo Studien

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Dermale Applikation von Arzneistoffen.....	2
1.2 Cyclodextrine in Dermatika.....	10
1.3 Vitamin D-Analoga und Psoriasis.....	15
1.4 Problemstellung.....	17
2 UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE.....	18
2.1 Substanzen	18
2.1.1 Methylprednisolonaceponat.....	18
2.1.2 Calcitriol-Analogon.....	19
2.1.3 Cyclodextrine	21
2.1.3.1 Allgemeines.....	21
2.1.3.2 Verwendete Cyclodextrine	25
2.1.3.3 Herstellung von Kavitäten	26
2.1.3.4 Charakterisierung von Kavitäten	28
2.2 Liberation von Steroiden aus halbfesten Arzneiformen	34
2.2.1 In-vitro-Liberation.....	34
2.2.2 Diffusionskinetik.....	35
2.2.3 Verteilungskoeffizient Vehikel / Akzeptormedium	39
2.2.4 Versuchsdurchführung.....	40
2.2.5 Ergebnisse und Diskussion.....	41
2.2.5.1 Membranvarianten	41
2.2.5.2 Vehikelvarianten.....	45
2.2.5.3 In vitro-Permeation durch Maushaut	47
2.2.5.4 Zusammenfassung.....	50
2.3 Einschlußverbindungen des Vitamin-D₃-Analogon mit β- Cyclodextrin-Derivaten	52
2.3.1 Theoretische Betrachtungen zum Vitamin-D ₃ -Analogon / β-Cyclodextrin-Assoziat	52
2.3.2 Untersuchungen	57
2.3.3 Ergebnisse und Diskussion.....	58
2.3.3.1 Herstellung der Kavitate.....	58
2.3.3.2 Charakterisierung der Calcitriol-Analogon / β-Cyclodextrin-Assoziat.....	59
2.3.3.2.1 Phasenlöslichkeitsdiagramme	59
2.3.3.2.2 Berechnung der Komplexstabilitätskonstanten.....	61
2.3.3.2.3 Gehaltsbestimmung.....	62

2.3.3.2.4	Differential Scanning Calorimetrie	63
2.3.3.2.5	Thermomikroskopie	69
2.3.3.2.6	¹ H-NMR-Spektroskopie	70
2.3.4	Resümee	72
2.4	β-Cyclodextrin-Kavitate in Dermatika	75
2.4.1	Versuchsdurchführung	75
2.4.2	Formulierungen	76
2.4.3	In-vitro-Liberation	79
2.4.3.1	Salben auf Kohlenwasserstoffbasis	79
2.4.3.1.1	Dimeb	79
2.4.3.1.2	Weitere Cyclodextrin-Derivate	81
2.4.3.2	Hydrogele auf Polyacrylatbasis	86
2.4.3.3	Hydrogele mit Liposomen	88
2.4.4	In-vivo-Studien am Tiermodell	89
2.4.4.1	Ergebnisse	90
2.4.4.2	Vergleich der In-vitro- / In-vivo-Daten	95
2.4.5	Stabilitätsuntersuchungen	98
3	ZUSAMMENFASSUNG	100
4	EXPERIMENTELLER TEIL	104
4.1	Substanzen	104
4.2	Geräte	106
4.3	Methoden	108
4.3.1	Herstellung wässriger Lösungen des Calcitriol-Analogon (CA) mit Cyclodextrinen	108
4.3.2	Herstellung von Liposomen	109
4.3.3	Herstellung fester Kavitate	109
4.3.4	Herstellung physikalischer Mischungen	111
4.3.5	Beschichtung der Cuprophan-Membran mit Silikonöl	111
4.3.6	Herstellung der halbfesten Zubereitungen	112
4.3.7	In-vitro-Liberationsuntersuchungen	113
4.3.8	Untersuchungen an Maushaut	114
4.3.9	In-vivo-Untersuchungen	115
4.3.10	Gehaltsbestimmungen	116
4.3.11	Differential Scanning Calorimetrie (DSC)	118
4.3.12	Licht- und Thermomikroskopie	119
4.3.13	Phasenlöslichkeitsuntersuchungen	119
4.3.14	¹ H-NMR-Spektroskopie	119
4.3.15	Rheologische Untersuchungen	120
4.3.16	Statistische Prüfverfahren	121
5	TABELLENANHANG	122
6	LITERATUR	119

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Schematischer Aufbau des Stratum corneum nach Barry [20].....	4
Abb. 2	Liberationsmodell nach Loth [40]	7
Abb. 3	Drehscheibenzelle nach Moll / Bender [4]	8
Abb. 4:	Schematische Darstellung der statischen Franz-Diffusionszelle FDC-400.....	9
Abb. 5:	Strukturformel von Methylprednisolonaceponat (MPA)	18
Abb. 6:	Strukturformel des Calcitriol-Analogons (CA): Isopropyl (5Z,7E,22E) - (1S,3R,24R) -1,3,24-Trihydroxy-9,10-secocholesta-5,7,10(19), 22-tetraene-25-carboxylat	20
Abb. 7	Schematische Darstellung eines Cycodextrin-Moleküls mit Lokalisation der Hydroxygruppen.....	22
Abb. 8:	Kristallstruktur eines β -Cyclodextrins (Seiten- und Vorderansicht) mit dem umgebenden Kristallwasser	23
Abb. 9	In-vitro-Freisetzung von Methylprednisolonaceponat (MPA) aus Advantan®-Fettsalbe durch verschiedene Membranen unter Verwendung von Methanol / Phosphatpuffer sowohl als Akzeptormedium als auch zur Imprägnierung, $n=3$, $R^2>0,99$	42
Abb. 10:	In-vitro-Freisetzung von Methylprednisolonaceponat (MPA) aus Advantan®-Fettsalbe. Imprägnierung: mit Klammern, Akzeptor-medium: ohne Klammern. (PVP): 5%ige Lsg. Polyvinylpyrrolidon, (PhP/PG): Phosphatpuffer / Propylenglycol, (MeOH/PhP): Methanol/ Phosphatpuffer	43
Abb. 11:	In-vitro-Freisetzung von Methylprednisolonaceponat (MPA) aus Advantan-Fettsalbe durch die Polycarbonat -und Cuprophan-Membran sowie ohne Membran, (Imprägnierung in Klammern, Akzeptormedium ohne Klammern), Isopropylmyristat (IPM), Methanol/Phosphatpuffer (MeOH/PhP).....	44
Abb. 12:	In-vitro-Freisetzungsprofile von MPA aus Advantan-Fettsalbe, -Salbe, und -Creme durch die Cuprophan-Membran unter Verwendung von Methanol / Phosphatpuffer sowohl als Akzeptormedium als auch zur Imprägnierung, $n=6$, $P=0,05$, $R^2>0,99$	46
Abb. 13:	In-vitro-Freisetzungsprofile (<i>intakte Maushaut</i>) von ^3H -Methylprednisolon- aceponat (^3H -MPA) aus Advantan-Fettsalbe, -Salbe und Lösung, BSA- Puffer als Akzeptormedium	49
Abb. 14:	In-vitro-Freisetzungsprofile (<i>gestrippte Maushaut</i>) von ^3H - Methylprednisolonaceponat (^3H -MPA) aus Advantan-Fettsalbe, -Salbe und Lösung, BSA-Puffer als Akzeptormedium	50
Abb. 15:	Calcitriol-Analogon: GRID-Interaktionsfelder unter Verwendung einer aliphatischen Hydroxylprobe (dunkel gezeichnet) und einer Ethersauerstoffprobe (hell gezeichnet)	55
Abb. 16:	Calcitriol-Analogon: GRID-Interaktionsfelder unter Verwendung einer Methylprobe (hell).....	56

Abb. 17:	β -CD: GRID-Interaktionsfelder unter Verwendung einer aliphatischen Hydroxylprobe (dunkel gezeichnet) und einer Methylprobe (hell gezeichnet)	56
Abb. 18:	Phasenlöslichkeitsdiagramm des Calcitriol-Analogen in wässriger β -CD-Lösung (pH=6,5) bei 25°C.....	60
Abb. 19:	Phasenlöslichkeitsdiagramm des Calcitriol-Analogen in wässriger Dimeb-Lösung (pH=6,5) bei 25°C	60
Abb. 20:	Phasenlöslichkeitsdiagramm des Calcitriol-Analogen in wässriger G ₂ - β -CD-Lösung (pH=6,5) bei 25°C	61
Abb. 21:	Phasenlöslichkeitsdiagramm des Calcitriol-Analogen in wässriger β -CD-Polymer-Lösung (pH=6,5) bei 25°C	62
Abb. 22:	DSC-Thermogramme von CA / β -CD-Systemen, a) reines CA, b) physikalische Mischung (1:7), c) Kopräzipitat (gewaschen), d) β -CD-Referenz	64
Abb. 23:	DSC-Thermogramme von CA / Dimeb-Systemen, a) reines CA, b) physikalische Mischung (1:2), c) Knetprodukt (ungewaschen), d) Knetprodukt (gewaschen), e) Dimeb-Referenz	65
Abb. 24:	DSC-Thermogramme von CA / G ₂ - β -CD-Systemen a) reines CA, b) physikalische Mischung (1:5), c) Knetprodukt (ungewaschen), d) Knetprodukt (gewaschen), e) G ₂ - β -CD-Referenz	66
Abb. 25:	DSC-Thermogramme von CA / β -Cyclodextrin-Polymer-Systemen (1:2), a) reines CA, b) physikalische Mischung, c) Knetprodukt (ungewaschen), d) Knetprodukt (gewaschen), e) β -CD-Polymer-Referenz.....	67
Abb. 26:	DSC-Thermogramme von CA / CE- β -CD-Systemen, a) reines CA, b) physikalische Mischung, c) Knetprodukt (ungewaschen), d) Knetprodukt (gewaschen), e) CE- β -CD-Referenz	68
Abb. 27:	DSC-Thermogramme von CA / HP- β -CD-Systemen, a) reines CA, b) physikalische Mischung, c) Knetprodukt (ungewaschen), d) Knetprodukt (gewaschen), e) HP- β -CD-Referenz	69
Abb. 28:	Thermomikroskopische Aufnahmen der physikalischen Mischung aus CA und β -CD.....	69
Abb. 29:	Thermomikroskopische Aufnahmen des CA / β -CD-Kopräzipitats	69
Abb. 30:	Freisetzungsprofile von CA / Dimeb-Systemen aus einer Triglycerid-Kohlenwasserstoff-Grundlage in Methanol / Wasser bei 32°C (n=6, P=0,01)	79
Abb. 31:	Freisetzungsprofile von verschiedenen CA / β -Cyclodextrin-Systemen aus einer Triglycerid-Kohlenwasserstoff-Grundlage in Methanol / Wasser bei 32°C (n=6, P<0,01)	82
Abb. 32:	Freisetzungsprofil eines CA / β -CD-Systems gegenüber reinem CA und einer physikalischen Mischung aus einer Kohlenwasserstoff-Grundlage (V) in Methanol / Wasser bei 32°C (n=6, P<0,01)	83

Abb. 33:	Freisetzungsprofile der Systeme CA / Dimeb und CA / G ₂ - β -CD gegenüber reinem CA aus Hydrogelen in Methanol / Wasser bei 32°C (n=6, P<0,01)	87
Abb. 34:	Epidermis-Hyperplasie	92
Abb. 35:	Epidermis-Hyperplasie, Verum- abzüglich Placebowirkung	93
Abb. 36:	Serumcalciumkonzentration	94
Abb. 37:	Serumcalciumkonzentration, Verum- minus Placebowirkung.....	95
Abb. 38:	Prävitamin des CA	98
Abb. 39:	Stabilität von CA in TK-Formulierungen bei 25°C und 40°C.....	99
Abb. 40:	Hydrogelherstellung	112
Abb. 41:	Chromatogramm von CA (V-Rezeptur): a) CA, b) Prävitamin	118

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Pharmazeutisch relevante β -Cyclodextrine	11
Tabelle 2:	Ausgewählte β -Cyclodextrine für CA-Einschlüsse	26
Tabelle 3:	Charakteristika der Membranen	41
Tabelle 4:	Freisetzungsraten von MPA durch synthetische Membranen in Abhängigkeit von Imprägnierung und Akzeptormedium.....	42
Tabelle 5:	Freisetzungsraten von MPA durch die Cuprophan-Membran, imprägniert mit Methanol / Phosphatpuffer (1:1, V/V) aus Advantan-Fettsalbe, -Salbe, und -Creme	46
Tabelle 6:	Rheologische Daten von Advantan-Fettsalbe, -Salbe und -Creme	47
Tabelle 7:	Komplexstabilitätskonstanten (K) der verschiedenen Komplexe in wässriger Lösung	62
Tabelle 8:	Gehalt an CA und molare Verhältnisse	63
Tabelle 9:	Zusammensetzungen der Testvehikel	78
Tabelle 10:	Freisetzungsraten aus der Triglycerid-Kohlenwasserstoffgrundlage (TK)	80
Tabelle 11:	Freisetzungsraten aus einer Kohlenwasserstoffgrundlage (V)	84
Tabelle 12:	Franz-Diffusionszellsysteme	108
Tabelle 13:	Herstellungsverfahren zur Bildung fester Kavitate	110

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MPA	Methylprednisolonaceponat
CA	Calcitriol-Analogon
CD	Cyclodextrin
β -CD	β -Cyclodextrin
Dimeb	1,8-Dimethyl- β -cyclodextrin
β -CD-Polymer	β -Cyclodextrin-Polymer
G ₂ - β -CD	Maltosyl- β -cyclodextrin
HP- β -CD	Hydroxypropyl- β -cyclodextrin
CE- β -CD	Carboxyethyl- β -cyclodextrin
DSC	Differential Scanning Calorimetry
RP-HPLC	Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PG	Propylenglycol
PhP	Phosphatpuffer
MeOH	Methanol
IPM	Isopropylmyristat
FDA	Food and Drug Administration
USP	United States Pharmacopeia
TK	Triglycerid-Kohlenwasserstoff-
V	Kohlenwasserstoff-
UpM	Umdrehung pro Minute

1 Einleitung

Im letzten Jahrzehnt hat die externe Therapie zunehmend an Interesse gewonnen. Das läßt sich nicht nur auf klassische dermatologische Wirkstoffe beziehen, sondern zeigt sich auch in der kutanen Applikation von Arzneistoffen mit systemischer Wirkung. Die Gründe dafür liegen sowohl in der Erforschung neuer hoch wirksamer Substanzen als auch in der Entwicklung von Arzneiträgern (Vehikeln), mit denen neue Wege der lokalen Applikation im Hinblick auf kontrollierte Freisetzung (sustained release) und zielgerechte Arzneistoffabgabe (drug targeting) beschritten werden sollen.

Im Hause Schering befindet sich zur Zeit ein neues Calcitriol-Analogon in der Entwicklung. Dieser vom aktiven Vitamin D₃ (Calcitriol) abgeleitete Arzneistoff ist anti-psoriatisch wirksam. Allerdings besitzt diese Substanzklasse aufgrund ihrer hohen Potenz auch unerwünschte irritativ lokale Wirkungen und einen ausgeprägten hypercalcämischen Effekt (Calcinose-Wirkung). Ziel ist es, mit der Neuentwicklung eine größere therapeutische Breite und eine geringere Hautirritation im Vergleich zu etablierten Vitamin D-Analoga zu erreichen. Es sind hierbei zwei mögliche Wege zu beschreiten: In biochemischer Hinsicht müßte eine neue Verbindung schnell nach perkutaner Resorption metabolisiert werden, um systemische Verfügbarkeit zu minimieren, dabei aber ein hohes Maß an lokaler Effektivität gewährleisten. In pharmazeutisch-technologischer Hinsicht könnte die Steuerung der Liberationsrate eines hochpotenten Arzneistoffs aus dem Vehikel, in Verbindung mit einer bevorzugten Lokalisation des Wirkstoffs in der Epidermis einen entscheidenden Beitrag leisten. Der Einschluß des Vitamin D-Analogons in Cyclodextrin-Moleküle könnte z.B. zu einer Beeinflussung des Liberationsverhaltens führen und gegebenenfalls die Irritationsstärke des Wirkstoffs herabsetzen. Wünschenswert wäre ferner eine geringere systemische Verfügbarkeit zugunsten höherer lokaler Effektivität.

1.1 Dermale Applikation von Arzneistoffen

Die Haut bestimmt in entscheidender Weise das Leben und Erleben des Organismus in seiner Umwelt. Von der Zellmembran des Einzellers bis hin zum hochspezialisierten, verhornenden Plattenepithel des Menschen sichert eine intakte Haut die Integrität des Lebewesens, indem sie es vor Flüssigkeitsverlust und Eindringen gefährdender Fremdstoffe bewahrt [1]. Mit einer Fläche von 1,6 bis 2 m² und einem Anteil von etwa 20 % vom Körpergewicht eines Erwachsenen ist die Haut das größte Organ des Menschen [2]. Die zunehmende Ausweitung ihrer Möglichkeiten und Kapazitäten im Laufe der Evolution zeigt sich in Schutz, Abwehr, Sinneswahrnehmung und Homöostase. Zur Erfüllung dieser Aufgaben haben sich in den drei Schichten Subcutis (Unterhaut), Dermis (Korium, Lederhaut) und Epidermis (Oberhaut) zum Teil hochspezialisierte Strukturen entwickelt, die die verschiedenen Funktionen erfüllen [3].

Die Haut ist im Vergleich zu anderen Zielorganen einer Therapie besonders leicht zugänglich. Dies zeigt sich auch in der Vielfalt der Applikationsformen [4]. Dermatika im eigentlichen therapeutischen Sinne stellen Zubereitungen dar, deren Wirkstoffe die lebende Epidermis und die Dermis erreichen sollen. Die dermale Applikation hat somit das Ziel, lokal begrenzte pharmakologische Wirkung zu erzielen [5]. Die systemische Verfügbarkeit (transdermale Applikation) ist in diesem Fall nicht erwünscht [6].

Da die Epidermis von besonderer Bedeutung für die Penetration von Arzneistoffen ist, soll im folgenden näher auf ihre Funktion eingegangen werden. Mit einem Anteil von etwa 90 % stellen die Keratinozyten den elementaren Baustein der Epidermis dar. Der Keratinozyt durchläuft als multipotente Zelle verschiedene Differenzierungsgrade, bevor er am Ende seiner Lebenszeit [7] - nach etwa 35 bis 45 Tagen - als Hornschuppe von der Hornzellschicht abgestoßen wird (Prozeß der Keratinisierung) [8].

Die unterste Zellschicht der Epidermis stellt die Basalzellschicht dar, in der der Keratinozyt als Basalzelle zunächst proliferierende Eigenschaften besitzt. Nach seinem Übertritt in die mittleren Zellschichten der Epidermis - die Stachelzell- und die Granularzellschicht, die den lebenden Teil der Epidermis darstellen - übernimmt der Keratinozyt verschiedene Differenzierungsfunktionen [3]. Das Hauptdifferenzierungsprodukt des Keratinozyten stellt das α -Keratin dar, das ca. 80 % des Proteinanteils in der späteren Hornschuppe ausmacht. Darüber hinaus werden Keratohyalin granula synthetisiert, deren Folge-

produkte gemeinsam mit den α -Keratinfilamenten die Matrix der späteren Hornschuppe darstellen [9,10]. Umschlossen wird diese Matrix von einer widerstandsfähigen quervernetzten Hülle („cornified envelope“), die aus einem in der Zellperipherie synthetisierten Protein und der außen liegenden Plasmamembran gebildet wird [11,12]. Die so erhaltenen Einzelbausteine werden interzellulär durch spezialisierte Lipide miteinander verkittet. Zu diesem Zweck bildet der Keratinozyt in seinem Zytosol sogenannte „Membran-coating-granules“, deren lamellare Körperchen in der Lage sind, mit der Plasmamembran der Keratinozyten zu verschmelzen und so ihren Inhalt in den Interzellularraum zu entleeren [13]. Diese lamellaren Körperchen beinhalten ursprünglich an neutrale Zucker gebundene Lipide und Proteine, hydrolytische Enzyme und freie Sterole. Die Zusammensetzung der Sekrete ändert sich während der Entwicklungsstadien der Keratinozyten. Als Syntheseprodukte werden in den Schichten des Stratum corneum Phospholipide, Cholesterole, neutrale Lipide, Sphingolipide und Ceramide gefunden [14,15,16,17]. Im Interzellularraum kommt es nachfolgend zum Rearrangement der kurzen, flachen Scheiben zu der charakteristischen Lipid-Doppelmembran. Hat der Keratinozyt die verschiedenen Differenzierungsstadien durchlaufen, erreicht er das Stadium der Transformation: Durch Freisetzung verschiedener Zellenzyme werden selektiv Organellen, wie Mitochondrien, das raue endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat, aufgelöst und teilweise ausgeschleust. Aus dem lebenden, sich differenzierenden Keratinozyten entsteht somit der tote Keratinozyt (Korneozyt bzw. Hornschuppe), der gemeinsam mit der Lipid-Doppelmembran die oberste Zellschicht der Epidermis, die Hornzellschicht (Stratum corneum), ausbildet, die den toten Teil der Epidermis darstellt.

Der lebende Teil der Epidermis besitzt keine Barriereigenschaften, kann aber durch in ihr vorhandene metabolisierende Enzyme die Resorption von Arzneistoffen beeinflussen [1819]. Der tote Teil der Epidermis - die Hornzellschicht - stellt als oberste Schicht der Epidermis das eigentliche Barriersystem der Haut dar [20,21]. Die intensive Barrierefunktion ist darauf zurückzuführen, daß der betreffende Arzneistoff nacheinander hydrophile, lipophile und dann wieder hydrophile Schichten passieren muß [22]. Da die Hornschuppen hauptsächlich aus Proteinen bestehen und das Zwischenzellvolumen, das mit 10 bis 30 % des Gewebes einen außergewöhnlich hohen Anteil einnimmt, aus spezialisierten Lipiden besteht, stellt die Hornzellschicht ein echtes Zwei-Komponentensystem dar.

Somit sind zwei potentielle Wege der perkutanen Wirkstoffpermeation durch die Hornzellschicht denkbar: die interzelluläre Passage durch die Lipidmembran zwischen den Zellen oder die transzelluläre Passage, bei der der Wirkstoff alternierend durch Hornschuppen und extrazelluläre Lipidmembran diffundiert. Die Prinzipien der Arzneistoffpassage durch das Stratum corneum sind in Abb. 1 schematisch dargestellt. Das Ausmaß der Permeation eines Wirkstoffs hängt damit maßgeblich von zwei Faktoren ab:

- von den physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs
- von der Schichtdicke, dem Lipid- und dem Wassergehalt der Hornzellschicht.

Die Schichtdicke der Hornzellschicht variiert intraindividuell [23] (je nach Körperregion) und interindividuell [24] in einem Bereich von 5 μm bis 600 μm [1]. Die Effektivität der Barriere der Hornzellschicht unterschiedlicher Regionen ist allerdings weniger von der Dicke als von der Zusammensetzung der Hornschuppen und des interzellulären Materials abhängig [25].

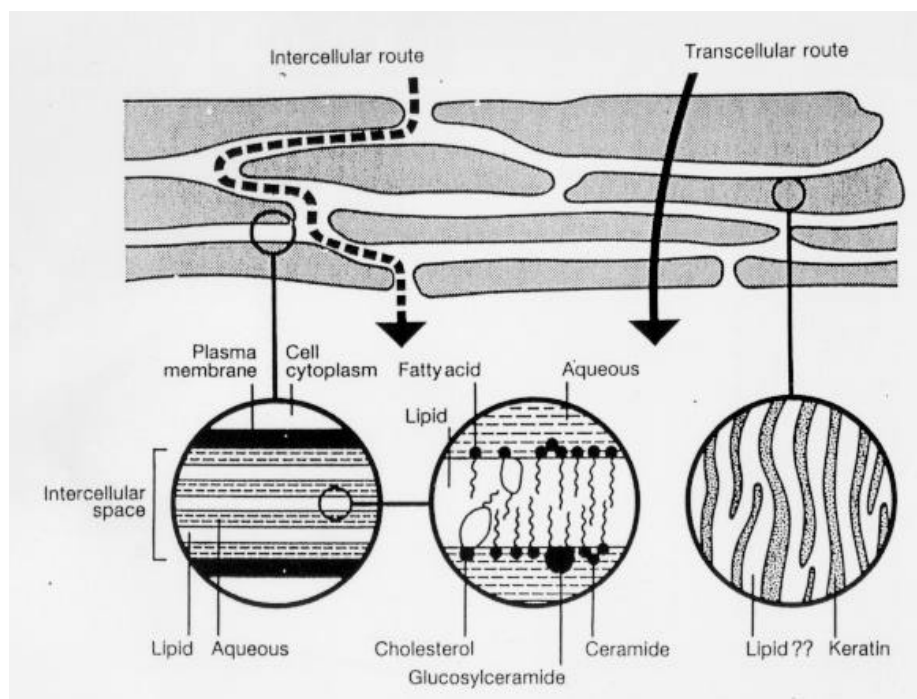


Abb. 1 Schematischer Aufbau des Stratum corneum nach Barry [20]

Darüber hinaus ist eine Wirkstoffpermeation durch die sogenannten Hautanhangsgebilde möglich: Die Abkömmlinge der Epidermis - Haarfollikel mit Talgdrüsen und Duftdrüsen (apokrine Drüsen), ekkrine Schweißdrüsen und Nägel bieten für Wirkstoffe Kanäle („Shunts“), die eine Aufnahme unter Umständen erleichtern können (transfollikuläre und transglanduläre Permeation). Allerdings macht der Anteil der Haarfollikel und Schweißdrüsenführungsgänge nur ca. 0,1 % des Gesamtvolumens der Haut aus [1,26].

Die Hautoberfläche besitzt einen Hydrolipidfilm, welcher eine Komposition von Talg, von den Talgdrüsen sezerniert, wasser- und fettlöslichen Substanzen aus der Hornschicht und Schweiß darstellt [27]. Diese Mischung bildet Emulsionen vom W/O- und O/W-Typ und schützt die Haut vor Austrocknung [28].

Eine direkte Beeinflussung der perkutanen Resorption konnte bisher nicht im Zusammenhang mit dem Wasser-Fettfilm der Hautoberfläche nachgewiesen werden [28]. Es ist allerdings anzunehmen, daß Dermatika im Kontakt mit dem Hautoberflächenfilm Wechselwirkungen und Veränderungen erfahren können.

Der Weg von Arzneistoffen durch die Haut läßt sich in folgenden Schritten beschreiben:

- **Liberation**
 - Übertritt aus Grenzfläche Feststoff / Vehikel
 - Diffusion im Vehikel zur Grenzfläche Haut / Vehikel
- **Penetration**
 - Verteilung zwischen Hornschicht / Vehikel (Verteilungskoeffizient)
 - Wechselwirkung mit Bestandteilen des Stratum corneum (ggf. Depotbildung)
 - Übertritt Grenzfläche Hornschicht / lebender Teil der Epidermis (ggf. Metabolisierung, Wechselwirkung mit Membranstrukturen)
- **Permeation**
 - Diffusion in die Dermis (ggf. Metabolisierung, Wechselwirkung mit Membranstrukturen)
 - Aufnahme in den Blutkreislauf bzw. Penetration in die Subcutis (Depotbildung)

Im einzelnen ist eine Wirkstoffaufnahme in die Haut neben den beschriebenen passiven Diffusionsvorgängen von weiteren Faktoren abhängig. So sind die physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffs, Einflüsse des Vehikels, und der aktuelle Zustand der Haut von entscheidender Bedeutung [29]. Zum Beispiel wird aufgrund eines geringen

Wassergehalts im Stratum corneum die Diffusion von Wirkstoffen in die Epidermis besonders erschwert sein. Eine Hydratisierung wird durch Okklusion erreicht [30]. Die Hornschicht kann das Drei- bis Fünffache ihres Gewichts an Wasser aufnehmen und wird in diesem Zustand permeabler. Salben besitzen oft okkludierende Wirkung, führen dann zur Quellung und Erweichung der Hornschicht und fördern damit unter Umständen die Wirkstoffpenetration. Sie eignen sich daher zur Behandlung infiltrierter, chronisch-entzündlicher Dermatosen. Das Risiko einer Hautirritation ist jedoch bei der Okklusion erhöht.

Mit wachsendem Interesse wird die Frage nach der Modulierbarkeit der Wirkstoffpenetration gestellt. Inzwischen existiert eine große Anzahl von Stoffen, die die Penetration verstärken. Der Einsatz von Enhancern wird in einer Reihe von Publikationen beschrieben [31,32,33,34]. Eine Übersicht wird z.B. in einen Artikel von Neubert et al. gegeben [35]. Im Gegensatz dazu gibt es nur wenige Untersuchungen über Substanzen, die die Penetration herabsetzen [36]. Dies könnte bei hochpotenten, gut permeablen Stoffen erwünscht sein, wenn nur eine lokale Wirkung angestrebt wird. Zum Einsatz gelangen hier Modulatoren, die als sogenannte Retarder oder Reducer fungieren. Dabei besteht die Möglichkeit, Einfluß auf die Barrierefunktion der Hornschicht, auf die Liberation aus dem Vehikel und / oder die Abgabe des Wirkstoffs aus einem Komplex zu nehmen [35].

Der Einfluß des Vehikels spielt bei der Modulation der Wirkstoffpenetration eine außerordentlich große Rolle. Die Art der Verteilung eines Wirkstoffs und seine Wechselwirkungen im Vehikel sind für die Liberation und damit für den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Arzneistoffaufnahme durch den Organismus verantwortlich.

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus Arzneiformen ist in den vergangenen Jahren in wachsendem Maße mit In-vitro-Methoden untersucht worden. Neue Methoden sind hinzugekommen, primär für Dermatika und transdermale Systeme [4]. Diese sind nicht unumstritten, weil die Durchführung der Methoden nicht einheitlich ist und ihre Aussagefähigkeit teilweise ungenügend differenziert wird. Deshalb ist es elementar, die Zielvorstellung klar zu definieren. Unterschieden werden sollte zweckmäßig zwischen Arzneistoff-Liberation, -Penetration und -Permeation.

Unter der Vielzahl der In-vitro-Membranmodelle hat sich der Horizontal-Modelltyp ("finite-dose-technique") durchgesetzt [37,38,39], bei dem horizontal angeordnete synthetische Membranen mit einem niedrigen Diffusionswiderstand Donator- und Akzeptorkompartiment trennen. Die applizierte Probe entspricht hierbei therapeutischen Mengen und Konzentrationen. Freisetzungsmethoden mit exzidierter Human- oder Tierhaut erweisen sich für Liberationsmessungen als weniger geeignet, da standardisierbare Bedingungen schwer zu realisieren sind. Im folgenden werden drei etablierte Liberationsapparaturen beschrieben, die sich innerhalb der Systematik der In-vitro-Modelle dem Typ der "finite-dose-technique" zuordnen lassen.

Salbenliberationszelle nach Loth

Mit dem Liberationsmodell nach Loth [40], von der Firma Sartorius (Göttingen) produziert, kann das Arzneistoff-Freisetzungsverhalten aus Salbengrundlagen mit unterschiedlichen Eigenschaften untersucht werden. Der Arzneistoff diffundiert aus der Salbenzubereitung durch eine double-layer-Membran in ein flüssiges Akzeptormedium. Diese hydrophile/lipophile Zweischichtenmembran ist sowohl für Salbengrundlagen als auch für das Akzeptormedium (Wasser) undurchlässig. Die Salbenliberationszelle besteht aus drei durch Bolzen und Muttern zusammengehaltenen Plexiglasplatten, in zwei dieser Platten sind Kammern eingelassen (Salbenkammer und Akzeptorkammer), die durch die Membran getrennt sind. Der Temperiererraum in der mittleren Platte wird von Temperierwasser von 32°C durchströmt. Die Diffusionsfläche beträgt ca. 16 cm². Die Akzeptorkammer besitzt ein Volumen von 100 ml.

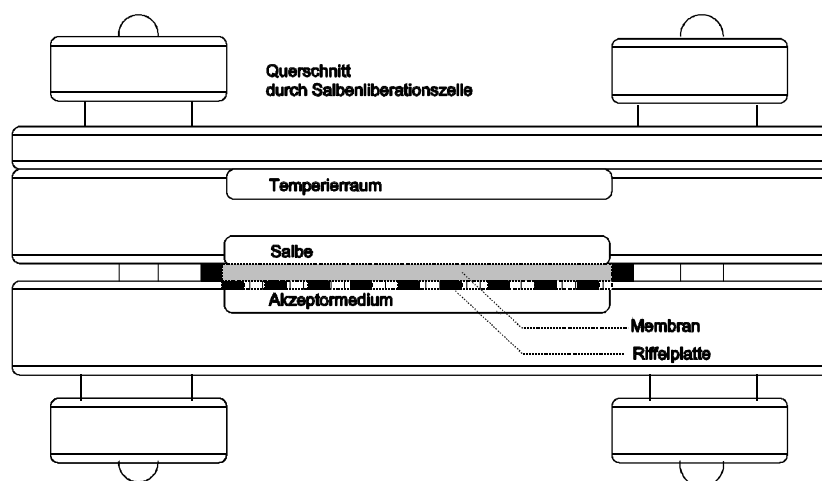


Abb. 2 Liberationsmodell nach Loth [40]

Drehscheibenzellen-Modell nach Moll / Bender

Das Modell besteht aus einem Rührgefäß, einer Donatorzelle, bestehend aus Donator und Schnapping (Teflon®), sowie einem thermostatisierbaren Wasserbad. Ein passender Gefäßdeckel verhindert das Verdampfen des Akzeptormediums. Die Drehscheibenzelle sorgt durch ihre Rotation für die erforderlichen Durchmischungsverhältnisse im Akzeptorraum. Die im System das Freisetzungsverhalten eines Arzneistoffs beeinflussenden Parameter sind in ihrer Zahl überschaubar sowie eindeutig zu charakterisieren. Das Drehscheibenzellen-Modell nach Moll / Bender [4] wird als eine einfach zu handhabende, gut reproduzierbare Ergebnisse liefernde In-vitro-Freisetzungsapparatur beschrieben.

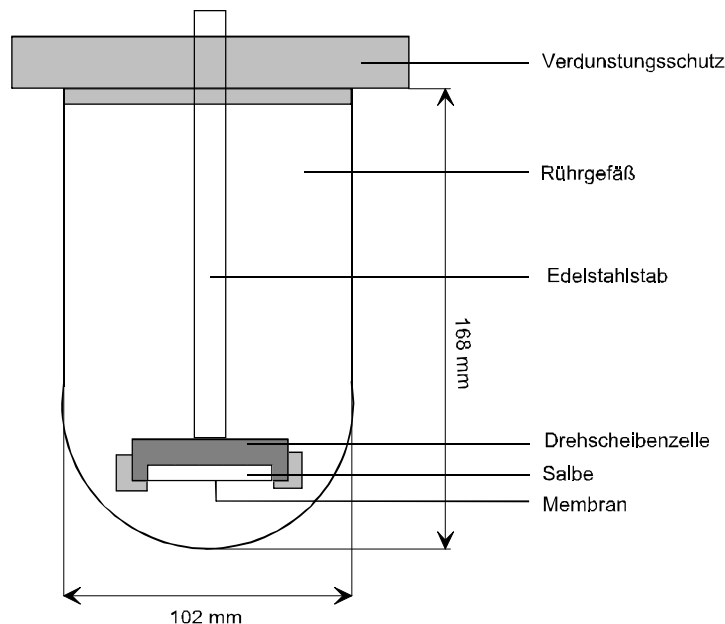


Abb. 3 Drehscheibenzelle nach Moll / Bender [4]

Franz Diffusionszellsystem

Die ursprünglich von Franz [41] entwickelte „statische“ Diffusionszelle wurde bisher vor allem für Untersuchungen der Kinetik perkutaner Resorption herangezogen. Die Zellen haben Akzeptor-Kompartimente mit effektiven Volumina zwischen 10 und 18,5 ml und Membran-Flächen zwischen 1,6 und 4,9 cm². Die Akzeptor-Lösung wird mittels Magnetrührer durchmischt und durch zirkulierendes Wasser in einem Mantel, der das Akzeptor-Kompartiment umschließt, temperiert. Modifizierungen der Geometrie der Rezeptorkammer, Durchflußverfahren, Automatisierung und der Einsatz von

synthetischen Membranen erweitert ihren Einsatzbereich: So werden modifizierte Franz-Diffusionszellen inzwischen neben Untersuchungen zur perkutanen Absorption auch für Liberationsuntersuchungen herangezogen.

Die „statische“ Franz-Diffusionszelle ist für Untersuchungen von Systemen mit geringen Freisetzungsraten und sehr niedrig dosierten Dermatika besser geeignet als entsprechende Franz-Durchflußzellen, da in letzterem Fall durch den Abtransport des Arzneistoffs aus dem Akzeptor die analytische Erfassung grenzwertig wird. Auch etablierte „statische“ Liberationsmethoden für Corticosteroide aus Hydrogelen und Cremes lassen aus ausgesprochen lipophilen Salbengrundlagen eine Detektion des Arzneistoffs im Akzeptormedium oft nicht mehr zu [37]. Eine schematische Darstellung der „statischen“ Franz-Diffusionszelle zeigt Abb. 4.

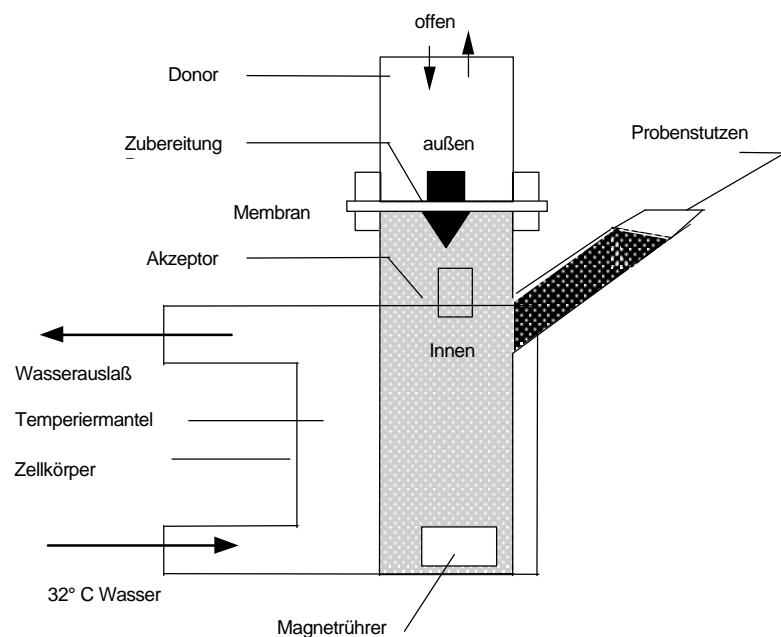


Abb. 4: Schematische Darstellung der statischen Franz-Diffusionszelle FDC-400

Derzeit existiert keine einheitliche Methodik, was auch auf das Fehlen einer Richtlinie über In-vitro-Liberationsmethoden für Dermatika in den Arzneibüchern zurückzuführen ist. Eine Arbeitsgruppe der *Food and Drug Administration (FDA)* [42] plant die Aufnahme einer Liberationsmethode für Dermatika als Qualitätskontrolle in das US-Arzneibuch.

Inzwischen sind auch in Europa, in Anlehnung an die Untersuchungen der FDA, erfolgreich topische Formulierungen getestet worden [z.B.38]. Die vorgestellte In-vitro-Liberationsmethode wird als einfache, verlässliche und reproduzierbare Methode beurteilt, die geeignet ist, Arzneistoff-Freisetzungseigenschaften einzuschätzen und batch-to-batch Uniformität von dermalen Topika zu sichern. Ferner soll sie der Erhebung von Daten ("release-rates") im Zusammenhang mit vergleichenden Untersuchungen der Dermatika von Innovationsfirmen und Generika-Herstellern dienen. Die Erhebung von Liberationsdaten könnte auch Hilfestellung bei der Entwicklung von Produktionsverfahren geben. Liberationsprofile sind ein wichtiger Parameter in bezug auf die Reproduzierbarkeit des Herstellverfahrens beim "scaling-up" von Pilot-Chargen bis zur Endfertigung.

1.2 Cyclodextrine in Dermatika

Seit Jahren sind Cyclodextrine Thema zahlreicher Arbeiten im pharmazeutischen Bereich, insbesondere auf dem Gebiet der pharmazeutischen Technologie. Aufgrund der Fähigkeit von Cyclodextrinen, Moleküle einzuschließen, führt die damit verbundene sterische Beeinflussung und elektrische Wechselwirkung zur Änderung physiko-chemischer Eigenschaften, wie Stabilität und Löslichkeit (Cyclodextrine 2.1.3). Diese Änderung der Eigenschaften kann in vielen Fällen vorteilhaft ausgenutzt werden im Hinblick auf die Herstellung optimierter Arzneiformen.

Bevorzugt angewendet werden derzeit β -Cyclodextrine und -Derivate. Eine zusammenfassende Darstellung pharmazeutisch relevanter β -Cyclodextrine ist in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Pharmazeutisch relevante β -Cyclodextrine

	Charakteristik ¹ :	Mögliche Anwendung:
β -Cyclodextrin	kristallin; relativ gering wasserlöslich	oral, mukosal ² , dermal
Hydrophile Derivate <u>Methylierte β-Cyclodextrine:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Dimeb • TM-β-Cyclodextrin 	löslich in kaltem Wasser und organischen Lösungsmitteln; oberflächenaktiv, hämolytisch	oral, dermal
<u>Hydroxyalkylierte β-Cyclodextrine:</u> <ul style="list-style-type: none"> • 2-HE-β-Cyclodextrin • 2-HP-β-Cyclodextrin • 3-HP-β-Cyclodextrin • 2,3-DHP-β-Cyclodextrin 	amorphe Mischung verschiedener Substitutionsgrade; hervorragend wasserlöslich; niedrige hämolytische Aktivität	oral, mukosal, parenteral
<u>Verzweigte β-Cyclodextrine:</u> <ul style="list-style-type: none"> • G₁-β-Cyclodextrin • G₂-β-Cyclodextrin • (G₂)₂-β-Cyclodextrin 	homogene Komponenten, wasserlöslich, niedrige hämolytische Aktivität	oral, mukosal, parenteral
Hydrophobe Derivate <u>Ethylierte β-Cyclodextrine:</u> <ul style="list-style-type: none"> • DE-β-Cyclodextrin • TE-β-Cyclodextrin 	wasserunlöslich, oberflächenaktiv	oral, subkutan
Ionisierbare Derivate <u>Anionische β-Cyclodextrine:</u> <ul style="list-style-type: none"> • CME-β-Cyclodextrin • CE-β-Cyclodextrin • β-Cyclodextrin Sulfat • β-Cyclodextrin Phosphat 	pKa = 3 bis 4 pKa = 3 bis 4 pKa < 1	oral, dermal, mukosal

¹ siehe auch Tabelle 2: Ausgewählte β -Cyclodextrine für CA-Einschlüsse² mukosal: nasal, sublingual, ophtalmisch, pulmonal, rektal, vaginal, etc

zu Tabelle 1

Dimeb	2,6-Di-methyl- β -Cyclodextrin	G ₁	Glucosyl
TM	2,3,6-Tri-methyl	G ₂	Maltosyl
2-HE	2-Hydroxyethyl	(G ₂) ₂	Di-Maltosyl
2-HP	2-Hydroxypropyl	DE	2,6-Di-O-ethyl
3-HP	3-Hydroxypropyl	TE	2,3,6-Tri-O-ethyl
2,3-DHP	2,3-Di-hydroxypropyl	CME	O-Carboxymethyl-O-ethyl
		CE	Carboxyethyl

In den Anfängen der Forschungsarbeit mit Cyclodextrinen sind vornehmlich Komplexe (Kavitate) im Hinblick auf die orale Applikation untersucht worden. Der parenterale Einsatz von Cyclodextrinen war lange Zeit kein Thema in der Cyclodextrinforschung, da die geringe Wasserlöslichkeit und hämolytische Aktivität des bislang einzigen großtechnisch verfügbaren nativen β -Cyclodextrins (β -CD) entgegen standen. Mit der Entwicklung hochwasserlöslicher Derivate, die vom Organismus besser toleriert werden, wuchs das Interesse für weitere Applikationswege. Im Zuge dessen ist in den letzten Jahren auch eine Zunahme der Arbeiten zu verzeichnen, die sich mit der Anwendung von Cyclodextrinen in Dermatika befassen.

Cyclodextrine können in Dermatika verschiedene Funktionen erfüllen. Sie dienen zur Verbesserung von Arzneistoffeigenschaften, z. B. zur Erhöhung von Stabilität und Bioverfügbarkeit und zur Verhinderung von Inkompatibilitäten. Die am meisten untersuchten Gruppen von Arzneistoffen in Dermatika, assoziiert mit Cyclodextrinen, sind Retinoide, Corticoide und nicht-steroidale Antiphlogistika [43].

β -Cyclodextrine werden in der Literatur hinsichtlich ihres Einflusses auf dermale und transdermale Applikation beschrieben. So konnten Gerloczy et al. [44] an Markierungsversuchen demonstrieren, daß eine perkutane Resorption von Dimeb in geringem Ausmaß möglich ist. Arima et al. [45] bestätigten für β -CD oder seine Derivate Dimeb und HP- β -CD zumindest eine Penetration in das Stratum corneum und den lebenden Teil der Epidermis trotz ihrer hohen Molmassen und der unterschiedlichen externen Hydrophilie oder Polarität.

Okamoto et al. [46] konnten 1986 in vitro die Erhöhung der Penetration von Sulfanilsäure in Form eines schwachen Komplexes mit Dimeb aufzeigen. Sie ermittelten, daß der Sulfanilsäure / Dimeb-Komplex geringfügig in die Haut penetriert, was 1994 von Vollmer et al. [47] in vivo bestätigt wurde. Beide Arbeitsgruppen fanden vor allem eine Erhöhung der Resorptionsrate von Arzneistoffen, wenn die Haut mit den entsprechenden β -Cyclo-

dextrinen vorbehandelt war, keine Komplexbildung stattfand oder lediglich eine schwache Wechselwirkung zwischen Gastmolekül und β -Cyclodextrin vorhanden war. Der Enhancer-Effekt durch β -Cyclodextrine wird einer Herabsetzung der Barrierefunktion der Haut zugeschrieben, welche durch Extraktion von Cholesterol und Triglyceriden aus Membrankomponenten der Haut resultiert [48,49].

Eine perkutane Resorptionserhöhung von Prednisolon [50,51] und Beclomethason-dipropionat [52] durch β -CD und γ -Cyclodextrin wird beschrieben.

Im Gegensatz dazu wurde die perkutane Resorption von Butylparaben und Indometacin in Gegenwart von β -CD oder Dimeb vermindert [46]. Dieses könnte auf eine starke Ausprägung der Komplexe in Hinblick auf hohe Komplexstabilitätskonstanten zurückzuführen sein. In diesem Fall wäre der Einfluß von β -CD und Dimeb auf die Lipidbarriere der Haut eingeschränkt [46].

Penetrationsuntersuchungen von Hydrocortison in menschliche Hautschnitte zeigten unter dem Einfluß von β -CD und HP- β -CD eine starke Abhängigkeit der Penetrationsrate vom Vehikel. So wurden geringe Hydrocortison-Mengen mit hydrophoben Grundlagen und die höchsten mit einer O/W-Creme sowie einer Hydrogelformulierung gefunden. Die Verarbeitung der Einschlußverbindungen in den hydrophilen Grundlagen verminderte die Hydrocortison-Konzentration in den oberen Hautschichten, aber nicht in der Dermis. Es wird angenommen, daß der bevorzugte Penetrationsweg für leicht lösliche Einschlußverbindungen eher transfollikulär als transdermal ist [53].

Neben den Einflüssen auf Resorptionsvorgänge sind Untersuchungen über die Manipulation der Liberation von Arzneistoffen durch Cyclodextrine von großer Bedeutung. In-vitro-Freisetzungsstudien demonstrierten eine Erhöhung der Liberation von Betamethason aus verschiedenen hydrophilen Salbengrundlagen durch Einschluß mit β -Cyclodextrinen [54]. Hierfür werden die Löslichkeitsvermittlung durch Cyclodextrine und die verminderte Affinität des Glucocorticoids zum Vehikel verantwortlich gemacht.

In-vitro-Freisetzungsversuche mit Prednisolon aus Salbengrundlagen, die Dimeb-Einschlußverbindungen enthielten, zeigten eine Erhöhung der Prednisolon-Freisetzungsrates aus hydrophilen Grundlagen und eine Verringerung aus Fettgrundlagen [50].

Schnell lösliche Einschlußverbindungen eignen sich, um die Freisetzungsrates von Arzneistoffen aus unterschiedlichen Zäpfchengrundlagen zu verbessern [55], wobei die Höhe der Freisetzungsrates für jede Grundlage verschieden ist. Entsprechend den Freisetzungsprofilen von Flubiprofen aus Fettgrundlagen (Witepsol H15) wird die Reihenfolge der Anfangsfreisetzungsrates aus der Fettgrundlage wie folgt beschrieben: Dimeb > β -CD > Trimethyl- β -Cyclodextrin. Aus hydrophilen Grundlagen (Polyethylenglycol) wurde folgende Reihenfolge beobachtet: Dimeb > Trimethyl- β -Cyclodextrin > β -CD [56,57]. Generell war die Gesamtmenge an freigesetztem Arzneistoff aus der hydrophilen Grundlage viel größer als die aus Fettgrundlagen.

Im Zuge von Penetrationsstudien sind auch Untersuchungen zu möglichen Irritationseffekten von CD auf der Haut durchgeführt worden. Hierzu wurden wässrige Lösungen von β -CD und seinen Derivaten und deren Suspensionen in Vaseline an gesunde Probanden appliziert. Mittels Laser-Doppler-Velocimetrie konnten Variationen im Blutfluß in der Haut nach 24 h Okklusion aufgenommen werden. Die Messungen ergaben keine Unterschiede in der Irritationskraft der Cyclodextrin-Zubereitungen gegenüber den Placebos [43].

Irie und Uekama [58,59] berichteten eine Hemmung der Photosensibilität von Meerschweinchenhaut, durch Chlorpromazin-Cyclodextrinen-Komplexe. Der Effekt korrelierte mit der Größe der gemessenen Komplexstabilitätskonstanten.

1994 berichteten Amdidoche et al. [60] über In-vivo-Versuche mit Tretinoin- β -CD-Komplexen in Hydrogelen an gesunden Probanden. Die Untersuchungen zeigten eine signifikante Abnahme der Hautirritation gegenüber freien Verumzubereitungen. Eine CD-bedingte Maskierung von lokalen Irritationseffekten durch Arzneistoffe wurde u.a. auch am Beispiel von Ethyl-4-Biphenylylacetat durch Arima et al. [61] nachgewiesen.

Die Erhöhung der Löslichkeit der Retinoide in Wasser [62] in Kombination mit Cyclodextrinen und die damit verbundene Herstellbarkeit von Hydrogelen ohne Zusatz von Alkohol sei an dieser Stelle erwähnt. Weiterhin konnte die Stabilität von Retinoiden in Hydrogelen durch β -Cyclodextrine verbessert werden, ohne die Wirksamkeit zu beeinträchtigen [63].

Für einige Cyclodextrin-Derivate ist eine hämolytische Aktivität beschrieben. Diese Eigenschaft ist beim Einsatz von Cyclodextrinen in Dermatika von untergeordneter

Bedeutung, kann aber aufgrund möglicher Penetration einiger Cyclodextrin-Derivate in erkrankte Haut unter bestimmten Umständen eine Rolle spielen. Verzweigte Cyclodextrine besitzen eine geringere hämolytische Aktivität als unverzweigte Derivate. In Anwesenheit eines Gastmoleküls kann der hämolytische Effekt niedriger sein [93]. In jüngster Zeit sind zahlreiche Cyclodextrine hinsichtlich ihrer toxikologischen Eigenschaften evaluiert und als sicher eingestuft worden [64].

Andererseits wurde demonstriert, daß Cyclodextrine in niedrigen Konzentrationen humane Erythrozyten gegen osmotisch- und hitzeinduzierte Hämolyse schützen [65]. Darüber hinaus kann der hohe hämolytische Effekt einiger Arzneistoffe durch Cyclodextrin-Einschluß vermindert werden. Der schützende Effekt könnte bei dermalen Anwendung von Arzneistoffen, die Hämolyse induzieren oder lokale Irritationen verursachen, von Nutzen sein [66].

1.3 Vitamin D-Analoga und Psoriasis

In den letzten Jahren hat die Gruppe der Vitamin D-Analoga zunehmend an Interesse bei der topischen Behandlung der Psoriasis gewonnen [67,68]. Neben Calcipotriol (INN) ist inzwischen ein weiteres Derivat des aktiven Vitamin D₃, Tacalcitol (INN), als topische Zubereitung auf dem Markt. Die Firma Johnson & Johnson / Cilag ist im Begriff, noch ein weiteres Vitamin-D-Derivat als Dermatikum zu entwickeln.

Die Psoriasis ist charakterisiert durch Hyperproliferation und verminderte terminale Differenzierung epidermaler Zellen sowie Entzündung und Zellinfiltration durch T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Monozyten [69]. Der antipsoriatische Effekt des aktiven Vitamin D₃ (Calcitriol) liegt in der Hemmung der Proliferation und Induktion der normalen terminalen Differenzierung psoriatischer Keratinozyten, vermittelt durch die Bindung an den Vitamin D-Rezeptor [70]. Weiterhin wird angenommen, daß die immunomodellierende Eigenschaft des Calcitriols sowie die Proliferation von Lymphozyten einen Beitrag zur antipsoriatischen Aktivität leisten [71].

Allerdings besitzt das natürliche Calcitriol neben einer unerwünschten irritativen lokalen Wirkung einen ausgeprägten hypercalcämischen Effekt (Calcinose-Wirkung) [72], was

den therapeutischen Einsatz stark einschränkt. Synthetische Calcitriol-Analoga, wie z.B. Calcipotriol, zeigen eine deutlich geringere hypercalcämische Aktivität [73]. Trotzdem ist die topische Behandlung der Psoriasis mit Calcipotriol ähnlich restriktiv wie mit Vitamin D₃. Nur 30 % der Körperoberfläche können mit der therapeutischen Dosis ohne das Risiko einer Calcinose behandelt werden [74].

Es existieren Untersuchungen von Szejtli et al. [75], die einen Einschluß von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) in β -Cyclodextrine beweisen. ¹³C-NMR Spektren deuten darauf hin, daß zwei Cyclodextrinringe ein Molekül Cholecalciferol einschließen. 2:1-Kavitate bilden sich oft, wenn das Gastmolekül zu groß bzw. zu lang ist, um eine vollständige Beherbergung in einer Kavität zu finden und das andere Ende des Moleküls auch einer Komplexierung zugänglich ist [76].

Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Komplexierung von Vitamin D₃ zu einer Verbesserung der Wasserlöslichkeit, Abnahme der Sauerstoffaufnahme, Abnahme der Lichtempfindlichkeit, Erhöhung der Hitzestabilität und Verbesserung der Dispergierbarkeit des Vitamin D₃ führten [75].

Des weiteren wurde in der Vergangenheit versucht, Vitamin D₃ mit Derivaten von β -Cyclodextrinen zu komplexieren. Erfolgreich waren Einschlüsse mit hoch wasserlöslichen, verzweigten β -Cyclodextrinen und dem sehr gut löslichen HP- β -CD [77,78,79].

Sollte es möglich sein, das Calcitriol-Analogon erfolgreich in β -Cyclodextrine einzuschließen, wären eine deutliche Beeinflussung des Liberationsverhaltens und der per-kutanen Resorption denkbar. Ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist es, verschiedene Assoziate von β -Cyclodextrin-Typen mit dem bei der Fa. Schering AG entwickelten Calcitriol-Analogon zu untersuchen.

1.4 Problemstellung

Die Auswahl eines Vehikels für eine hochpotente Wirkstoffkomponente ist für die Steuerung der Freisetzung und damit für die Wirksamkeit und Verträglichkeit eines Dermatikums von entscheidender Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluß von β -Cyclodextrinen auf das Liberationsverhalten eines neuen Vitamin D-Analogon (Calcitriol-Analogon) in vitro und in vivo aus verschiedenen Vehikeln untersucht werden. Zielstellung ist daher die Herstellung und Charakterisierung von Assoziaten des neuen Calcitriol-Analogon mit verschiedenen β -Cyclodextrin-Derivaten sowie deren Liberation aus ausgewählten Formulierungen.

β -Cyclodextrin (β -CD), 1.8-Dimethyl- β -Cyclodextrin (Dimeb), β -Cyclodextrin-Polymer (β -CD-Polymer), Maltosyl- β -cyclodextrin (G_2 - β -CD), Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CD) und Carboxyethyl- β -Cyclodextrin (CE- β -CD) sind als mögliche Einschlußbildner zu überprüfen.

Für die Durchführung der In-vitro-Liberationsuntersuchungen ist eine empfindliche Methode zur Erfassung niedrig dosierter Wirkstoffe zu etablieren, die darüber hinaus ein hohes Diskriminierungsvermögen aufweist. Deshalb wird auf die Etablierung einer In-vitro-Freisetzungsmethode für niedrig dosierte Dermatika allgemein besonderer Wert gelegt, um im besonderen eine Bewertung des Freisetzungsverhaltens des neuen Arzneistoffs (Calcitriol-Analogon) unter Einfluß von β -Cyclodextrinen vornehmen zu können.

Die Entwicklung und Optimierung der In-vitro-Freisetzungsmethode wird am Beispiel von Glucocorticoid-Zubereitungen (Advantan[®], Schering AG) mit synthetischen Membranen vorgenommen. Diese In-vitro-Befunde sind mit haarloser Maushaut zu vergleichen und zu interpretieren. Ziel ist es, diese Ergebnisse und Erfahrungen auf spätere Liberationsstudien mit Cyclodextrin-Assoziaten zu übertragen. Schließlich sollen In-vivo-Untersuchungen an der Maus Daten zur Effektivität ausgewählter Komplexe in dermalen Zubereitungen für die Anwendung in der Psoriasistherapie liefern.

2 Untersuchungen und Ergebnisse

2.1 Substanzen

2.1.1 Methylprednisolonaceponat

Methylprednisolonaceponat (MPA) (Abb. 5) ist ein nicht halogener Diester des 6 α -Methylprednisolons und gehört zur Gruppe der partialsynthetischen Glucocorticoide. Als potentes Glucocorticoid leistet es in einer der wichtigsten Substanzgruppen zur topischen Behandlung von Hauterkrankungen seinen Beitrag [80]. Im Vordergrund bei der topischen Applikation stehen der antiphlogistische und antiproliferative (antimitotische) Effekt. Hinzu kommen eine immunsuppressive, antipruriginöse und vasokonstriktorische Wirkung [72].

MPA ist ein bei Raumtemperatur geruchloses, weißes Pulver. Es hat die Summenformel $C_{27}H_{36}O_7$ und besitzt eine relative Molmasse von 472,6 g/mol. MPA erweist sich als leicht löslich in Ethanol, Ethylacetat und Ether, schwer löslich in Aceton und praktisch unlöslich in Wasser.

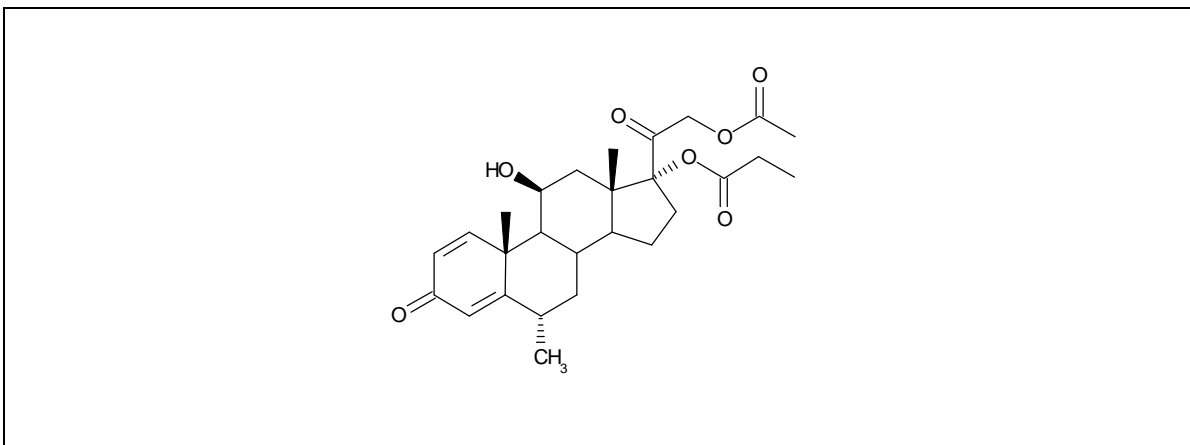


Abb. 5: Strukturformel von Methylprednisolonaceponat (MPA)

Für die Therapie ist MPA unter dem geschützten Namen Advantan® als 0,1%ige Zubereitung in Form einer Milch, Creme, Salbe und Fettsalbe im Handel. Die Präparate sind vorrangig bei endogenen Ekzemen, wie der atopischen Dermatitis und Neurodermitis, indiziert. MPA dient in der vorliegenden Arbeit als Modells substanz für die Einstellung optimaler Parameter bei Freisetzungsuntersuchungen von Steroiden und anderen Dermatika aus Salbensystemen.

2.1.2 Calcitriol-Analogon

Das Calcitriol-Analogon (CA) (Abb. 6) ist eine Modifikation des natürlichen Calcitriols (1 α ,25-Dihydroxy-cholecalciferol). Calcitriol ist ein aktiver Metabolit des *Colecalciferols* (INN), Vitamin D₃.

Unter D-Vitaminen versteht man aus Steroiden durch photochemische Reaktion gebildete Substanzen mit antirachitischer Wirkung [81]. Von diesen besitzt Vitamin D₃, das im menschlichen Körper durch Bestrahlung von 7-Dehydroxycholesterol (Provitamin D₃) mit UV-Licht in der Haut entsteht, die größte Bedeutung. Das in der Haut gebildete *Colecalciferol* gelangt in die Leber und wird dort mittels Cholecalciferol-25-Hydroxylase zu 25-Hydroxy-cholecalciferol hydroxyliert, welches im Fett- und Muskelgewebe gespeichert wird [82]. 25-Hydroxy-cholecalciferol wird schließlich in der Niere mittels 25-Hydroxy-cholecalciferol-1 α -Hydroxylase ein zweites Mal hydroxyliert; es entsteht das Calcitriol, die Hauptwirkform. Die an C-24 hydroxylierten Metaboliten besitzen kaum antirachitische Aktivität und gelten als Endprodukte des Vitamin-D-Stoffwechsels [83].

Vitamin D ist maßgeblich an der Regulation des Calcium-, Phosphat-, und Citrat-Haushalts im menschlichen Organismus beteiligt. In der Haut moduliert Vitamin D₃ epidermales Wachstum, Keratinisierung und Inflammation [83].

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, daß der aktive Metabolit Calcitriol eine hohe Effektivität bei topischer und oraler Behandlung der Psoriasis besitzt [84]. Der therapeutische Einsatz von Calcitriol und seinen Derivaten ist jedoch aufgrund ihrer unerwünschten irritativen lokalen Wirkung und des ausgeprägten hypercalcämischen Effektes (Calcinose-Wirkung) eingeschränkt [85,86].

Das CA lässt sich als Strukturvariante des Vitamin D₃ in die Reihe der Vitamin D₃-Derivate Calcipotriol (INN) und Tacalcitol (INN) einordnen. Es besitzt wie Calcipotriol eine Hydroxy-Gruppe am C-Atom 24 und eine Doppelbindung am C-Atom 23, variiert aber mit einer Isopropylesterkomponente in der Seitenkette. Die IUPAC-Bezeichnung des CA lautet Isopropyl (5Z,7E,22E) - (1S,3R,24R) - 1,3,24-Trihydroxy-9,10-secocholesta-5,7,10(19),22-tetraene-25-carboxylat. Wie in der systematischen Nomenklatur des Colecalciferols wird vom Steroid-Kohlenwasserstoff Cholestan ausgegangen. Das Präfix *seco* mit den vorangestellten Lokanten 9,10 drückt unter Beibehaltung der Bezifferung des Steroidsystems die Ringöffnung zwischen C-9 und C-10 aus.

Das CA ist ein bei Raumtemperatur geruchloses, weißes kristallines Pulver. Es hat die Summenformel C₃₁H₄₈O₅ und besitzt eine relative Molmasse von 500,719 g/mol. Entsprechend eigenen Untersuchungen erweist sich das CA als leicht löslich in Ethanol, Ethylacetat und Ether und praktisch unlöslich in Wasser.

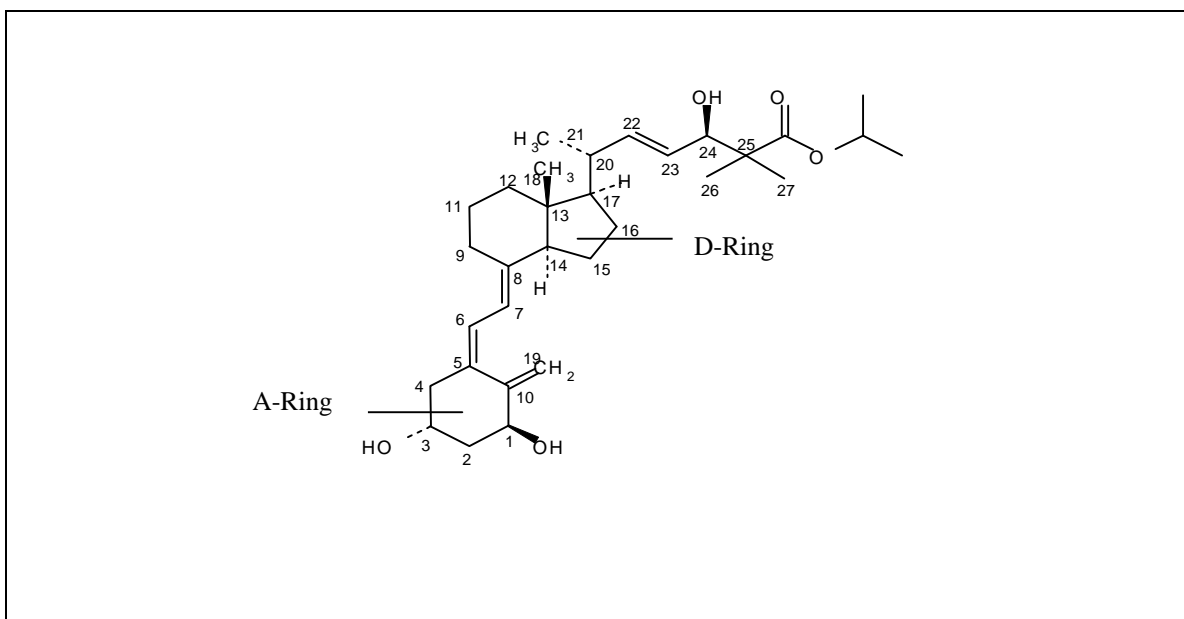


Abb. 6: Strukturformel des Calcitriol-Analogons (CA): Isopropyl (5Z,7E,22E) - (1S,3R,24R) - 1,3,24-Trihydroxy-9,10-secocholesta-5,7,10(19),22-tetraene-25-carboxylat

2.1.3 Cyclodextrine

2.1.3.1 Allgemeines

Cyclodextrine sind zyklische, nicht reduzierende Maltooligosaccharide in Torusform, die durch enzymatischen Abbau von Stärke hergestellt werden können. Sie bestehen aus α -D-Glucoseeinheiten, die über 1,4-glycosidische Bindungen ringförmig miteinander verknüpft sind. Die wichtigsten Cyclodextrine bestehen aus 6, 7 oder 8 Glucosemolekülen und werden als α -Cyclo-, β -Cyclo- und γ -Cyclodextrine bezeichnet. Durch die ringförmige Verknüpfung der Glucosemoleküle entstehen Hohlräume mit Durchmessern von 0,5 nm, 0,65 nm bzw. 0,8 nm [76,87]. Cyclodextrine sind in der Lage, mit Gastmolekülen Einschlußverbindungen (Kavitate) zu bilden, ohne daß es zur Ausbildung einer echten, kovalenten Bindung kommt. Wesentliche Voraussetzung hierfür ist die richtige Größe des Gastmoleküls, das den Hohlraum gut ausfüllen muß [87]. Große Moleküle können teileingeschlossen werden, dazu müssen sie über ein in den Hohlraum passendes Strukturelement verfügen [88]. Hydrophobe Moleküle haben dabei eine größere Affinität zum Hohlraum als Moleküle oder Teile von ihnen, die hydrophil sind.

Treibende Kräfte bei der Einschlußbildung mit polaren bzw. polarisierbaren Gastmolekülen sind VAN-DER-WAALS'SCHE Wechselwirkungen, bei unpolaren Substraten sind es hydrophobe Wechselwirkungen. Auch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Cyclodextrinen und Gast sind beschrieben worden [89].

In den Hohlraum lagern sich bevorzugt lipophile Strukturelemente ein, während polare Gruppen mit den hydrophilen Hydroxygruppen in Wechselwirkung treten.

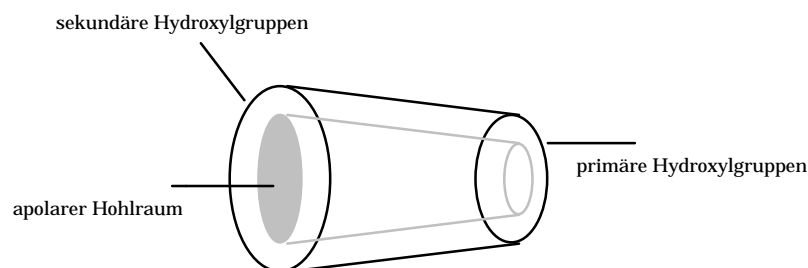


Abb. 7 Schematische Darstellung eines Cycodextrin-Moleküls mit Lokalisation der Hydroxygruppen

In der Regel werden bei lipophilen Gastmolekülen die Wasserlöslichkeit und damit die Lösungsgeschwindigkeit verbessert. In manchen Fällen ist die Verbesserung der Lösungsgeschwindigkeit nicht auf eine verbesserte Löslichkeit zurückzuführen. Andere Parameter, wie molekulardisperse Verteilung des Arzneistoffs, vergrößerte Oberfläche und verbesserte Benetzbarkeit, sind in diesem Zusammenhang ebenso zu berücksichtigen, wie die verminderte Kristallinität vieler Kavitate.

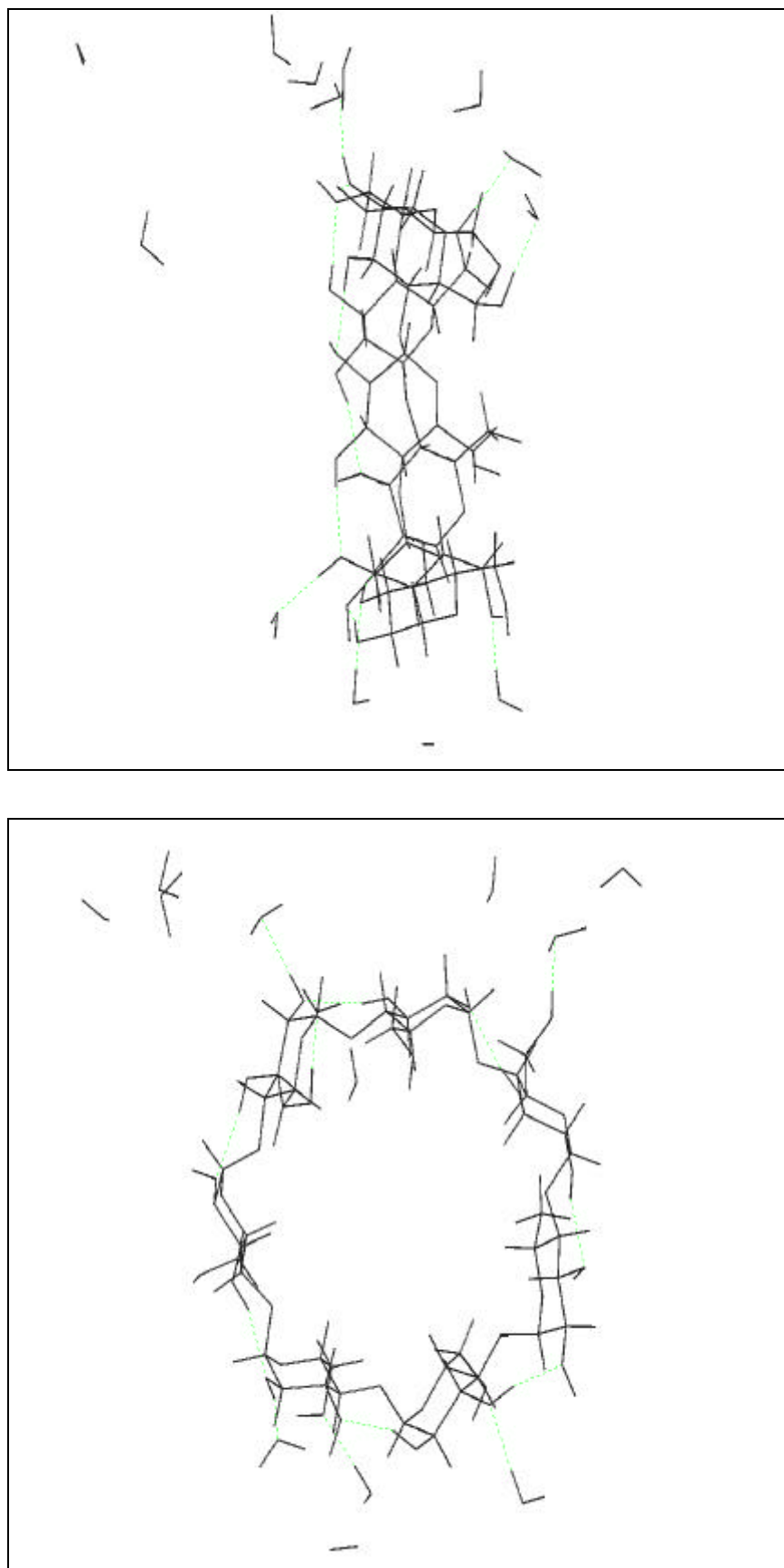


Abb. 8: Kristallstruktur eines β -Cyclodextrins (Seiten- und Vorderansicht) mit dem umgebenden Kristallwasser [90].

Diverse Cyclodextrin-Derivate wurden synthetisiert, um die Einschlußkapazität für eine Anzahl von Arzneistoffen zu erhöhen [91]. Diese chemisch modifizierten Cyclodextrine können in vier Gruppen eingeteilt werden:

Unter den *hydrophilen* Cyclodextrinen haben die alkylierten, hydroxyalkylierten und verzweigten CDe aufgrund ihrer nicht vorhandenen oder sehr geringen Toxizität und hohen Wasserlöslichkeit besondere Beachtung erlangt [92]. Eines der bekanntesten Vertreter der hydrophilen Cyclodextrin-Derivate ist das Heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -Cyclodextrin (Dimeb). Seine Wasserlöslichkeit ist signifikant höher als die des nativen β -CD, wahrscheinlich aufgrund seiner geringen Kristallgitterenergie im festen Zustand und der starken Hydratation in wässriger Lösung.

Hydroxyalkylierte Cyclodextrin-Derivate sind eine amorphe Mischung von chemisch verwandten Komponenten mit verschiedenem Substitutionsgrad. Es wird dadurch Kristallisation verhindert, und dies ist der Grund für die hohe Wasserlöslichkeit. Die Oberflächenaktivität der hydroxyalkylierten Cyclodextrin-Derivate ist, bedingt durch die polaren Hydroxy-Gruppen, im allgemeinen geringer als die der alkylierten Cyclodextrin-Derivate.

Unter verzweigten Cyclodextrinen versteht man solche, bei denen ein oder zwei primäre Hydroxy-Gruppen mit Mono- oder Di-Sacchariden durch $\alpha(1-6)$ Verknüpfung verbunden sind. Als Vertreter sind das Glycosyl- (G_1), Maltosyl- (G_2) und Di-Maltosyl- ($(G_2)_2$) Cyclodextrin bekannt. Ihre Auflösungsgeschwindigkeit in Wasser ist gegenüber nativem Cyclodextrin und den alkylierten Cyclodextrin-Derivaten sehr hoch. Sie werden wegen ihrer besonders guten Verträglichkeit als Arzneistoffträger für Parenteralia empfohlen [93]. Es wurde eine vergleichsweise hohe Affinität von Steroiden zu verzweigten Cyclodextrinen gefunden [66].

Hydrophobe Cyclodextrine besitzen die Möglichkeit, als Wirkstoffträger wasserlöslicher Gastmoleküle zu fungieren, um ggf. durch Herabsetzen ihrer Wasserlöslichkeit die Freigaberraten zu verringern [94]. Durch Substitution der Hydroxy-Gruppen im Cyclodextrin-Molekül mit Ethyl-, Acetyl- oder längeren Alkyl-Gruppen wird die Wasserlöslichkeit dieser Komponenten mit steigender Kettenlänge vermindert. Ethylierte Cyclodextrine z.B. sind weniger hygroskopisch, aber oberflächenaktiver als unsubstituierte Cyclodextrine.

Ionische Cyclodextrine unterscheiden sich in vielen Effekten gegenüber nicht ionischen Cyclodextrin-Derivaten [95]. Insbesondere anionische Derivate stehen in der Diskussion als Träger von Wirkstoffen für eine gesteuerte Freisetzung. Ihre Wasserlöslichkeit hängt im wesentlichen vom pH-Wert der Lösung ab. CE- β -CD, in dem die Hydroxy-Gruppen des β -CD mit Carboxyethyl-Gruppen verethert sind, ist mit dem Ziel, als Wirkstoffträger für eine kontrollierte Freisetzung im intestinalen Bereich eingesetzt zu werden, synthetisiert worden [96].

Produkte, die zwei oder mehr kovalent gebundene Cyclodextrin-Einheiten enthalten, werden als *Cyclodextrin-Polymere* bezeichnet. Sie werden in der Regel mit Epichlorhydrin als Verknüpfungsmittel hergestellt. Cyclodextrin-Polymere können wasserlöslich sein, wasserunlöslich und stark quellend oder leicht quellend als amorphe Pulver. Die Cyclodextrin-Einheiten behalten auch in polymerisierter Form ihre Fähigkeit, Kavitate zu bilden [97]. Wasserlösliche Cyclodextrin-Polymere werden als Substanzen definiert, die mindestens aus zwei Einheiten bestehen. Die untere Molekülmasse wasserlöslicher Cyclodextrin-Polymere liegt bei ca. 3000 g/mol, das obere bei ca. 10000 g/mol, bei mit Epichlorhydrin verknüpften Cyclodextrin-Polymeren bei ca. 20000 g/mol [98]. In der Regel bilden höher molekulare Cyclodextrin-Polymere gequollene unlösliche Gele [99].

2.1.3.2 Verwendete Cyclodextrine

Zur Assoziat (Kavität)-Bildung mit dem neuen CA gelangten die in Tabelle 2 aufgeführten β -Cyclodextrine zur Überprüfung. Die ausgewählten Cyclodextrine sind hinsichtlich ihrer chemisch-physikalischen und toxikologischen Eigenschaften für den Einsatz in Dermatika und für eventuelle In-vivo-Studien geeignet.

Tabelle 2: Ausgewählte β -Cyclodextrine für CA-Einschlüsse

	Löslich in	Unlöslich in
β-Cyclodextrin (β-CD) (MG: 1135 g/mol)	Wasser (1,85%)	Methanol Ethanol
1.8-Dimethyl-β-cyclodextrin (Dimeb) (MG: 1310 g/mol)	Wasser (150%) Methanol (100%) Ethanol	Ether
β-Cyclodextrin-Polymer (β-CD-Polymer) (MG: \approx 4000-4500 g/mol)	Wasser (>50%)	Aceton
Maltosyl-β-cyclodextrin (G_2-β-CD) (MG: 1495 g/mol)	Wasser (>100%)	Methanol Ethanol
Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) (MG: 1500 g/mol)	Wasser (50%) Methanol Ethanol DMSO	Ether
Carboxyethyl-β-cyclodextrin (CE-β-CD) (MG: 1279 g/mol)	Wasser (>100%) DMSO (50%)	Methanol Ethanol Chloroform

2.1.3.3 Herstellung von Kavitäten

Feste Cyclodextrin-Einschlußverbindungen lassen sich durch verschiedene Verfahren herstellen. Die Auswahl der Methode hängt im wesentlichen von den Lösungseigenschaften des Gastmoleküls und des Cyclodextrins ab und muß somit individuell ausgewählt werden. Drei etablierte Verfahren, die zur Herstellung von CD-Komplexen in der vorliegenden Arbeit dienten, werden näher beschrieben.

Knetmethode

Bei der Knetmethode wird das Gastmolekül zu einer Aufschlemmung des Cyclodextrins gegeben und kräftig, z. B. mittels Mörser und Pistill eingeknetet, bis eine Paste entstanden ist, die anschließend getrocknet wird. Die erhaltene Festsubstanz wird mit kleinen Mengen Lösungsmittel (z.B. Ether, Ethanol) gewaschen, um adsorbierte Reste der Gastkomponente zu entfernen. Diese Methode ist besonders für schwach wasserlösliche Wirkstoffe geeignet, da sich das Gastmolekül langsam durch Komplexbildung löst [100,101,102]. Vorteile der Knetmethode sind [103]:

- kurze Präparationszeit
- einfache Durchführung
- Sicherheit
- geringe Investitionskosten
- geringer Energieverbrauch
- hohe Effizienz - hohe Ausbeuten von Einschlußverbindungen (bis 98 %)

Der Nachteil der Knetmethode liegt in der geringeren Reinheit der entstehenden Komplexe im Vergleich zur Kopräzipitationsmethode.

Lyophilisationsmethode

Die Gastkomponente wird zusammen mit dem Cyclodextrin in einem geeigneten molaren Verhältnis unter Rühren in Wasser gelöst. Anschließend wird gefriergetrocknet, das Produkt mit Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Methode liefert lockere Addukte in sehr guter Ausbeute [101,102,104]. Die Lyophilisationsmethode ist für wasserlösliche oder thermolabile Gastmoleküle geeignet, da sie zusammen mit dem Cyclodextrin, bevorzugt in wässriger Lösung, gefriergetrocknet werden [105]. In einigen Fällen ist durch Zugabe von Lösungsvermittlern, wie Aceton oder Dioxan, das Verfahren auch schwer wasserlöslichen Wirkstoffen zugänglich.

Kopräzipitation

Durch Kopräzipitation läßt sich ein festes Kavat aus gesättigter wässriger Lösung isolieren. Die eingesetzten Mengen an Gastmolekül und Cyclodextrin orientieren sich am stöchiometrischen Verhältnis der Komponenten, welches sich aus dem Phasenlöslichkeitsdiagramm errechnet [114]. Die Komponenten werden in wässriger Lösung bis zum

Löslichkeitsgleichgewicht geschüttelt oder heiß gelöst und langsam durch Kühlen ausgefällt. Das Kavitat präzipitiert als mikrokristallines Pulver und wird durch Filtration abgetrennt und getrocknet [100,101,106]. Eine Modifikation dieser Methode besteht im Einsatz von wässrig-alkoholischen Mischungen als Lösungsmittel für schwer wasserlösliche Gastkomponenten. Diese Methoden sind bei Systemen mit A-Typ-Phasenlöslichkeitsdiagrammen nicht anwendbar, da das Kavitat nicht ausfällbar ist.

2.1.3.4 Charakterisierung von Kavitationen

Um die Bildung eines Komplexes zu bestätigen, kann die Interaktion zwischen Gastmolekül und Cyclodextrin anhand verschiedener indirekter Nachweismethoden untersucht werden. Die Ergebnisse mehrerer Methoden werden gemeinsam in die Bewertung einbezogen.

NMR-Spektroskopie

Einen Beweis für eine Einschlußverbindung in Lösung liefert im allgemeinen die ^{13}C - oder ^1H -NMR-Spektroskopie. Das Verfahren beruht auf der Resonanz-Wechselwirkung zwischen Radiowellen (d.h. einem hochfrequenten magnetischen Wechselfeld) und bestimmten Atomkernen der zu untersuchenden, meist flüssigen (gelösten) Substanz, die sich in einem sehr starken äußeren, homogenen Magnetfeld befindet. Grundlage der Messungen ist die Präzessionsbewegung, die Atomkerne mit Drehimpuls (Spin) und magnetischem Moment m in einem äußeren Magnetfeld um die Richtung des Magnetfeldes mit einer bestimmten Frequenz (Larmor-Frequenz ω) ausführen. Man kann mit der NMR-Spektroskopie Lage, Zahl und Bindungsart von organisch gebundenen Wasserstoff-Kernen = Protonen untersuchen, weshalb man auch von Protonenresonanz-(PMR-) Spektroskopie spricht, weil ^1H sowohl eine hohe natürliche Häufigkeit von 99,9% als auch ein großes magnetisches Moment aufweist. Im Frequenzbereich der Protonenresonanz gibt Deuterium kein Signal, weshalb perdeuterierte Verbindungen ideale Lösemittel abgeben.

Das angelegte äußere Magnetfeld wird durch die Induktionswirkung der Elektronen und durch die Felder benachbarter Kerne abgeschwächt, d.h. die „effektive Feldstärke“ ist geringer als die angelegte (Abschirmung, E shielding). Sie ist von Kern zu Kern in Abhängigkeit von der zugehörigen Elektronenverteilung verschieden. Diese auf der

Abschirmung durch die Elektronenhülle beruhende Verschiebung der Resonanzlinie gegenüber der des isolierten Atomkerns in Abhängigkeit vom Bindungszustand bezeichnet man jeweils als chemische Verschiebung (E chemical shift). Die chemische Verschiebung, d.h. die Lage eines Signals, wird statt in Hz in δ angegeben, und zwar in ppm. Aus der chemischen Verschiebung kann man Rückschlüsse darauf ziehen, welche chemischen Gruppen oder in welchen Bindungsverhältnissen die H-Atome vorliegen.

Zur Vereinfachung komplizierter Spektren bedient man sich darüber hinaus einiger Kunstgriffe. Mittels der Doppelresonanz strahlt man Radiowellen geeigneter Wellenlänge in die Probe, die selektiv die Frequenzabsorption von einzelnen (oder mehreren magnetisch äquivalenten) Kernen anregen, worauf die Multipletts der mit diesen koppelnden Kernen zu einer einzelnen Linie kollabieren. Mit dieser Spinentkopplung lassen sich einzelne Protonen „anpeilen“; spezielle Spielarten sind zum Beispiel der Kern-Overhauser-Effekt (engl. Abk.: NOE). Letzterer kommt durch magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen ^1H und ^2H oder ^{13}C auch durch den Raum hindurch und in Abhängigkeit von r^6 , zustande. Mit ihm erhält man eine Signal-Intensitätssteigerung und kann räumlich benachbarte, aber oft durch viele Bindungen getrennte Kerne einander zuordnen.

Eine Integration ist bei ^{13}C -Spektren schwieriger durchzuführen als bei Protonen-Spektren. Sie verlangt die Zugabe von sogenannten Relaxationsreagentien zur Probe und die Unterdrückung des NOE, der die relativen Signalflächen verfälscht.

Eine Möglichkeit des Nachweises von CD-Komplexen besteht darin, im Rahmen einer ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchung die Interaktion der im Inneren des Cyclodextrin-Torus lokalisierten Wasserstoff-Atome (H-3 und H-5) mit Strukturen des Gastmoleküls zu betrachten. Es kann durch Abschirmung dieser Protonen zu schwachen Hochfeldverschiebungen kommen [107]. Die Resonanzfrequenzen der äußeren Protonen sollten bei einem Kavitat wenig beeinflusst bleiben, um nicht gleichzeitig eine Assoziation des Gastes mit der Außenseite des Cyclodextrins anzunehmen. Dieses Verfahren führt aufgrund übereinanderliegender Signale und damit schlechter Auflösung häufig zu schwer interpretierbaren Spektren. Die Ursache ist unter anderem in der Unreinheit von Cyclodextrin-Derivaten zu suchen, die chemisch oft nicht einheitlich vorliegen. Es werden auch teilweise Lösungsmiteleinflüsse für Hochfeldverschiebungen der Protonen verantwortlich gemacht.

Die Aufnahme von NOESY-Spektren, die den Nachweis räumlicher Nähen erlaubt, ist eine weitere Möglichkeit, um die Assoziation zwischen Gastmolekül und Cyclodextrin zu erfassen. Allerdings sind auch hier „saubere Spektren“ Voraussetzung. Ein weiteres Problem von NMR-Untersuchungen liegt in der Probenvorbereitung, da viele Kavitäte in D₂O nur schwach löslich sind und somit keine ausreichenden Konzentrationen zur Erstellung aussagefähiger Spektren erreicht werden können. Organische Lösungsmittel führen daher oft zur Dissoziation der Kavitäte [108]. Der direkte Nachweis einer Kavität-bildung mittels NMR-Spektroskopie ist deshalb nicht immer möglich.

Thermoanalytische Verfahren

Eines der wichtigsten Instrumente für den Nachweis von Cyclodextrin-Komplexen in festem Zustand stellen thermoanalytische Verfahren dar, insbesondere die Differential Scanning Calorimetry (DSC) [62,109,110,111]. Diese Methode basiert darauf, daß in den Thermogrammen von eingeschlossenen Arzneistoffen durch die „molekulare Verkapselung“ die Schmelzpunktpeaks, die bei reinen kristallinen Arzneistoffen und den entsprechenden physikalischen Mischungen detektiert werden können, ausbleiben.

Thermoanalyse ist der Oberbegriff für Methoden, bei denen physikalische und chemische Eigenschaften einer Substanz, eines Substanzgemisches und / oder von Reaktionsgemischen als Funktion der Temperatur oder der Zeit erfaßt werden, wobei die Probe einem kontrollierten Temperaturprogramm unterworfen wird [112].

Bei der DSC wird der Wärmestrom zur Probe gemessen. Durch Integration des Wärmestromes, eigentlich eine Wärmeleistung (SI-Einheit: Watt), über die Zeit erhält man den Wärmeumsatz oder die Enthalpieänderung einer Probe [mJ]. Grundlage der quantitativen Bestimmung des Wärmeumsatzes bei der DSC ist ein definierter, von der Probe unabhängiger Wärmewiderstand [113].

Phasenlöslichkeitsdiagramm

Lipophile Arzneistoffe, welche in Wasser schwerlöslich sind, erfahren in Gegenwart von Cyclodextrinen oft eine Erhöhung ihrer Wasserlöslichkeit, was auf die Bildung eines wasserlöslichen Komplexes zwischen Arzneistoff und gelöstem Cyclodextrin zurückzuführen ist. Die Komplexbildung verringert die thermodynamische Aktivität der gelösten Fraktion des Arzneistoffs. Konsequenterweise wird sich mehr, das heißt so viel

Arzneistoff lösen, bis die Aktivität freier Substanz, welche in chemischem Gleichgewicht mit dem Komplex steht, gleich der Aktivität an reinem festen Arzneistoff ist. Das Phasenlöslichkeitsdiagramm nach Higuchi und Connors [114] dient als Methode zur Interpretation einer Einschlußbildung in wässriger Lösung. Zum einen gibt es Auskunft über die Löslichkeit des Wirkstoff / Cyclodextrin-Assoziats und erlaubt die Berechnung einer scheinbaren Komplexstabilitätskonstanten. Zum anderen können die Konzentrationsverhältnisse von Gastmolekül und Cyclodextrin ermittelt werden. Die Methode basiert darauf, daß eine jeweils gleiche Menge an Gastsubstanz, die größer als seine Sättigungskonzentration ist, in wässrigen Cyclodextrin-Lösungen steigender Konzentration bis zur Gleichgewichtseinstellung bei konstanter Temperatur gerührt wird. Die gemessene Konzentration an Gastsubstanz in Lösung wird gegen die Cyclodextrinkonzentration im Diagramm aufgetragen.

Die Löslichkeit von schwach wasserlöslichen Gastmolekülen erhöht sich unter steigender CD-Konzentration. Wenn sich eine lineare Korrelation ergibt (Komplex konstanter Zusammensetzung), wird die Isotherme als A_L -Typ bezeichnet. Abweichungen von der Linearität bei höheren CD-Zugaben können Isotherme vom A_P - und A_N -Typ ergeben. Im Falle des A_P -Typs steigt die Löslichkeit der Gastkomponente überproportional zur CD-Konzentration an; der umgekehrte Fall wird als A_N -Typ beschrieben. Hierbei sind die Stöcheometrien nicht konstant [114].

Erreicht ein linearer Anstieg der Isotherme ein Maximum, d.h. es wird mit steigender CD-Konzentration keine weitere Löslichkeitsverbesserung der Gastkomponente erreicht, so ist das Löslichkeitsprodukt des Komplexes überschritten und der Komplex fällt aus. Dieses Profil wird als B_S -Typ bezeichnet.

Die Existenz eines Komplexes in wässriger Lösung garantiert nicht die Bildung desselben in kristallinem Zustand. Deshalb muß nach Abtrennung einer festen Komponente die Bildung eines Kavitats erneut bestimmt werden.

Die Tendenz einer Substanz, einen Einschluß in Lösung zu bilden, wird durch die Komplexstabilitätskonstante beschrieben. Sie wird über die Steigung α der Geraden des Phasenlöslichkeitsdiagramms mit Gleichung 1 berechnet [76].

Gleichung 1

$$K = \frac{\tan \alpha}{[S_0] \cdot (1 - \tan \alpha)}$$

K: Komplexstabilitätskonstante

S₀: Sättigungskonzentration in Abwesenheit von CD

Die Berechnung der Konstanten anhand des Phasenlöslichkeitsdiagramms wird in der Literatur teilweise kritisch diskutiert. Szejtli [76] beschreibt die Stabilitätskonstante als virtuell, mit der Maßgabe, keine direkten Schlüsse auf die wahre Stabilität eines Komplexes ziehen zu können. Auch sollte berücksichtigt werden, daß alkylierte Cyclodextrine, wie Dimeb, oberflächenaktive Eigenschaften besitzen und damit eine verbesserte Benetzbarkeit der Gastkomponente in wässriger Lösung erreicht wird. Ein weiteres Problem bei substituierten Cyclodextrin-Derivaten ist die Tatsache, daß mit einer durchschnittlichen Molekülmasse gerechnet werden muß. Das Komplexierungsvermögen einzelner Komponenten ist möglicherweise unterschiedlich.

Weiterhin muß einkalkuliert werden, daß Cyclodextrine Wechselwirkungen mit der Außenseite ihres Torus verursachen. Dies hat zur Folge, daß teilweise unterschiedliche stöchiometrische Verhältnisse mit einer Gastkomponente und Cyclodextrinen eines Torusdurchmessers errechnet werden.

Röntgendiffraktometrie

Die Anwendung der Röntgendiffraktometrie zum Nachweis eines Kavitats im festen Zustand beruht auf der Ausbildung einer neuen Kristallstruktur, bedingt durch die Einschlußverbindung. Schon vor 20 Jahren sind Studien mittels dieser Technik publiziert worden [115]. Damals wurde eine Serie von Arzneistoff-CD-Komplexen mittels Röntgendiffraktometrie studiert. Voraussetzung ist jeweils das Vorliegen einer kristallinen Struktur des entstandenen Assoziats. Die meisten Kavitate mit Derivaten des nativen β-Cyclodextrin weisen jedoch amorphe Strukturen auf. Der Einsatz der Röntgendiffraktometrie kann in diesem Fall nur als zusätzlicher Hinweis einer möglichen Einschlußverbindung dienen, nämlich wenn kristalliner Arzneistoff durch molekulare Verkapselung in eine röntgenamorphe Struktur überführt wird.

In der Literatur wird eine Reihe weiterer Methoden der Charakterisierung von Kavitäten beschrieben. Insbesondere spektroskopische Analysemethoden, wie z.B. Infrarot-Spektroskopie [108,116], Raman-Spektroskopie [108,117] und Massenspektroskopie [108] werden heute zur Interpretation von Inklusionen in der Cyclodextrin-Forschung

herangezogen. Inzwischen werden zur Untersuchung von CD-Komplexen außerdem Scanning Electron Microscopy (SEM) und Fourier Transformation Infrared (FT-IR) Spectroscopy herangezogen [118,119].

2.2 Liberation von Steroiden aus halbfesten Arzneiformen

2.2.1 In-vitro-Liberation

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus topischen Zubereitungen innerhalb eines bestimmten Zeitraums ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Qualität einer Formulierung. Abweichungen im Liberationsverhalten lassen Rückschlüsse auf die Qualität der Ausgangsstoffe, auf Veränderungen oder Fehler im Herstellungsprozeß und nicht zuletzt auf die geeignete Wahl von Hilfsstoffen zu [4]. Da jede Zubereitung eine eigene Freisetzungsscharakteristik hat, lassen In-vitro-Liberationsstudien auf den Zustand und die Eigenschaften der Arzneiform schließen. Voraussetzung ist, daß die Liberationsgeschwindigkeit ausschließlich durch die Zubereitung determiniert wird, d.h. apparative Parameter die Meßergebnisse nicht signifikant beeinflussen. Zu ihnen gehören folgende Parameter:

- Membran
- Geometrie des Gerätes
- membranadhärierende Schichten
- Umpumpgeschwindigkeit des Akzeptors

Werden die Einflüsse dieser Faktoren minimiert, so ist eine bestmögliche Differenzierung verschiedener Zubereitungen zu erreichen. Die synthetische Membran ist aus kinetischen Gründen das Kernstück einer Apparatur, sie dient ausschließlich zur Trennung von Donator und Akzeptor und soll nicht die Haut simulieren.

Das Barrierepotential von porösen Membranen wird von der Möglichkeit der Moleküle, in Abhängigkeit von ihrer Größe, Form und elektrostatischen Interaktionen durch die Poren zu diffundieren, bestimmt. Porenmembranen können aus Cellulose oder Cellulose-Derivaten, wie Celluloseacetat und Cellulosenitrat, bestehen. Weiterhin gelangen Membranen auf Basis von synthetischen Polymeren, wie z.B. Polycarbonat oder Polyester, zum Einsatz. Im allgemeinen eignen sich solche Membranen aufgrund ihrer geringen Barriereigenschaften für In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen von Arzneistoffen aus halbfesten Zubereitungen. Dabei bleibt die transdermale Kinetik unberücksichtigt.

Bei nicht-porösen Membranen hängen die Barriereigenschaften von der Löslichkeit der diffundierenden Moleküle in der Membran (Polymermatrix) ab. Diese stellen oft aufgrund hoher Barriereigenschaften einen für die Freisetzung limitierenden Faktor dar und erhöhen somit die lag-time. Solche Diffusionsmembranen werden auch zur Simulation von biologischen Membranen (z.B. Humanhaut) eingesetzt [120]. In diesem Fall werden In-vitro- und In-vivo-Daten korreliert. Unter Umständen ist der Einsatz von Diffusionsmembranen bei In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen notwendig. Dieses ist dann der Fall, wenn mit Porenmembranen keine ausreichende Trennung zwischen Donator und Akzeptor erreicht wird. Zum Beispiel können Silikonmatrices (Silastic®) als Membranen zur Untersuchung von ausgesprochen hydrophilen Zubereitungen dienen. Der Einsatz von Porenmembranen führt in solchen Fällen oft zu unerwünschten hydrodynamischen Effekten.

Es ist also unter Umständen möglich, In-vivo-Permeation mittels eines spezifischen In-vitro-Diffusionszellsystems mit Einschränkungen zu simulieren. In der Literatur finden sich zahlreiche Studien zur Bewertung von perkutaner Resorption von Arzneistoffen mit Hilfe von In-vitro-Methoden und synthetischen Membranen [121,122].

Im Gegensatz zur Haut sollen synthetische Membranen für In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen einen möglichst niedrigen Diffusionswiderstand aufweisen. Beim Einsatz von Membranen sind die folgenden Eigenschaften von entscheidender Bedeutung [123]:

- Löslichkeit des Arzneistoffs in der Membran (bzw. Imprägnierung)
- Membranen sollten grundsätzlich leicht, und soweit möglich in genormter Ausführung zugänglich sein
- Homogenität des Materials
- ausreichende Porengröße der Membran
- geringe Dicke der Membran
- Haltbarkeit bzw. Formbeständigkeit
- saubere Abtrennung von Akzeptor- und Donatormedium

2.2.2 Diffusionskinetik

Die Freisetzung eines Arzneistoffs aus Suppositorien- und Salbengrundlagen wird grundsätzlich von verschiedenen Faktoren beeinflusst, z.B.:

- Vehikelzusammensetzung
- Arzneistoff / Vehikel-Interaktionen
- Löslichkeit des Arzneistoffs
- Thermodynamische Aktivität des Arzneistoffs
- Verteilungskoeffizient des Arzneistoffs
- Partikelgröße des Arzneistoffs im Vehikel
- Dispersitätsgrad
- Zusammensetzung des Akzeptormediums (pH, Ionenstärke, Polarität, Temperatur)

Die Liberationscharakteristik eines Wirkstoffs und sein Konzentrationsprofil in der Grundlage hängen insbesondere davon ab, ob er im Vehikel suspendiert, teilweise gelöst oder vollständig gelöst vorliegt. Je nach Löslichkeit des Arzneistoffs lässt sich bei Anwendung des 2. Fickschen Gesetzes die Wirkstofffreigabe nach Higuchi [124,125] in vereinfachten Beziehungen aufstellen. Die folgenden Betrachtungen sollen nur für Einphasensysteme gelten.

Im Falle einer vollständigen Lösung des Arzneistoffs in der Zubereitung, matrix-kontrollierter Freisetzung und ausreichend dicker Vehikelschicht ($C_t/F < 30-50\%$) gilt Gleichung 2 [126].

Gleichung 2

$\frac{C_t}{F} = 2 \cdot A \sqrt{\frac{D \cdot t}{p}}$	C_t : Konzentration zum Zeitpunkt t
	F : Membranfläche
	D : Diffusionskoeffizient im Vehikel
	A : Ausgangskonzentration
	t : Zeit

Die Gültigkeit von Gleichung 2 ist an folgende Voraussetzungen geknüpft [1]:

- Nur ein Arzneistoff ist in der Grundlage vollständig gelöst
- Die Vehikelzusammensetzung ändert sich während des Prozesses nicht
- Der Diffusionskoeffizient ist unabhängig von der Zeit und der Position der Wirkstoffmoleküle im Vehikel.
- Der Wirkstoff wird von der Akzeptorphase unverzüglich aufgenommen.

Liegt der Arzneistoff ungelöst im Vehikel vor, so gilt Gleichung 3 [125]. Sie ist eine näherungsweise mathematische Beschreibung der Liberationskinetik eines Arzneistoffs in einem In-vitro-Modell als matrixkontrollierte Diffusion aus Suspensionssalben. Diese wird ebenfalls in vereinfachter Form dargestellt in der Annahme, daß im Normalfall in einer Suspension die Konzentration der Wirkstoffpartikeln wesentlich größer ist als deren Sättigungslöslichkeit. Weiterhin unterliegt das Quadratwurzelgesetz folgenden Bedingungen [40,127]:

- Die Lösungsgeschwindigkeit der suspendierten Phase hat keinen Einfluß auf die Liberationsgeschwindigkeit
- Der perfekte "sink" beginnt unmittelbar an der Grenze zwischen Salbe und anliegendem Medium
- Im speziellen Fall der Anwendung auf Messungen in Membranmodellen muß der Diffusionswiderstand der Salbe viel größer sein als der der Membran
- Der Durchmesser der suspendierten Wirkstoffpartikeln ist sehr viel kleiner als die Dicke der Diffusionsschicht in der Salbe

Gleichung 3

$\frac{C_t}{F} = \sqrt{D \cdot C_s \cdot (2A - C_s) \cdot t}$	C_t : Konzentration zum Zeitpunkt t
	F : Membranfläche
	D : Diffusionskoeffizient im Vehikel
	C_s : Sättigungskonzentration
	A : Ausgangskonzentration
	t : Zeit

Der Liberationsprozeß weist drei Phasen auf:

1. Diffusionsfluß überwiegend membrankontrolliert
2. Diffusionsfluß annähernd gleichermaßen membran- und matrixkontrolliert
3. Diffusionsfluß überwiegend matrixkontrolliert ($m/t^{1/2}$ -Linearität)

Nach Ablauf einer unterschiedlich langen Anfangsphase wird die Liberation quasi-stationär, d. h., daß die freigesetzte Arzneistoffmenge der Wurzel aus der Zeit proportional ist. Nur bei Auswertungen in der matrixkontrollierten Phase werden zubereitungs-spezifische Werte erhalten. Die Auswertung erfolgt durch lineare Regression des linearen Teils der Liberationskurve [40].

Ein Vorteil der Higuchi-Gleichung ist ihre Einfachheit; ihr Nachteil ist, daß die Einhaltung der Voraussetzungen und Limitierungen zum Teil nur schwer kontrolliert werden kann.

2.2.3 Verteilungskoeffizient Vehikel / Akzeptormedium

Der Verteilungskoeffizient VK eines Arzneistoffs ist für die Verteilung zwischen einem Vehikel und dem Akzeptormedium definiert als [128]:

Gleichung 4

$$VK = \frac{f_v \cdot C_v}{f_A \cdot C_A}$$

C_A = Löslichkeit des Arzneistoffs im Akzeptormedium

C_v = Löslichkeit des Arzneistoffs im Vehikel

f_v = verfügbare Fraktionen an Substanz im Vehikel (dissoziiert)

f_A = verfügbare Fraktionen an Substanz im Akzeptor (dissoziiert)

Jede Veränderung von C_A oder C_v bedingt eine Änderung des Verteilungskoeffizienten. Ein niedriger VK-Wert korrespondiert mit einem hohen Grad an Interaktion mit dem Vehikel und der Tendenz der Substanz, im Vehikel zu verbleiben. Auf der anderen Seite zeigt ein hoher VK-Wert eine verminderte Affinität und eine höhere Freisetzungsrates aus dem Vehikel.

Hinsichtlich des Vehikeleinflusses sind zwei völlig verschiedene Fälle zu betrachten, nämlich Suspensionen und Lösungen. Die Vorhersagen der Verteilung des Arzneistoffs, die sich auf die Löslichkeit eines Arzneistoffs in einer Grundlage beziehen und für die Diffusion eine große Rolle spielen, sind nur für Lösungssalben relevant. Hier stellt sich unter der Annahme keiner Anreicherung von diffundierbarem Arzneistoff in der Membran ein quasistationärer Zustand ein und damit ein exponentieller Konzentrationsabfall im Vehikel. Im Falle von Suspensionssystemen spielt der Verteilungskoeffizient unter der Voraussetzung, daß die Sättigungskonzentration des Arzneistoffs im Vehikel aufrecht erhalten bleibt bzw. sich der Wirkstoff rasch nachlöst, eine untergeordnete Bedeutung [128,129].

2.2.4 Versuchsdurchführung

Zur Ermittlung der optimalen Parameter für Freisetzungsuntersuchungen aus halbfesten Zubereitungen wurden am Beispiel der Advantan[®]-Fettsalbe mit dem Corticosteroid MPA vier synthetische Membranen, imprägniert mit verschiedenen Agenzien, getestet. Zwei Akzeptormedien gelangten zum Einsatz. Weiterhin wurde die Freisetzung von MPA aus Advantan[®]-Salbe und -Creme bestimmt und mit Ergebnissen der Permeation des MPA durch haarlose, intakte und gestrippte Maushaut verglichen.

Als In-vitro-Liberationsapparatur diente das Diffusionszellsystem nach Franz [41] in einer Konsole mit Rührvorrichtungen (Apparatur 1, Geräte, 4.2). Die temperierte Akzeptorphase wurde blasenfrei in das Zellkompartiment eingefüllt und mit Hilfe eines Rührmagneten durchmischt. Das zu prüfende Dermatikum wurde in die offene Donatorvorrichtung der Zelle gebracht, indem die Prüfsubstanz auf die zuvor getränkte Membran mittels Einmalspritze oder Schablone appliziert wurde. Die Probenentnahmen von jeweils 1 ml erfolgten über den Gesamtzeitraum von sechs Stunden nach 30, 60, 120, 180, 240, (300) und 360 Minuten. Das Akzeptorkompartiment wurde nach jeder Probennahme mit der jeweils aliquoten Menge des Akzeptormediums aufgefüllt.

Die quantitative Erfassung des liberierten Arzneistoffs erfolgte mittels RP-HPLC. Durch Flächenvergleich nach der Methode des externen Standards wurden die Konzentrationen von freigesetztem Arzneistoff [$\mu\text{g/ml}$] berechnet. Nach Ablauf einer Anfangsphase (lag-time) wird die Liberation "quasistationär", d. h., die freigesetzte Menge an Arzneistoff ist der Wurzel aus der Zeit proportional. Nur für diese matrixkontrollierte Phase wurden zubereitungsspezifische Werte berechnet.

Vier handelsübliche synthetische Membranen auf Basis von Celluloseacetat, Polyester, Polycarbonat sowie regenerierter Cellulose wurden für die Untersuchungen herangezogen. Die Charakteristika der Membranen sind in Tabelle 3 angegeben.

Isopropylmyristat (IPM), 5%ige Lösung von Polyvinylpyrrolidon (Kollidon[®] 12 PF) bzw. Phosphatpuffer (0,066 M, pH 5,0) dienten, jeweils im Verhältnis 1:1 (V/V) mit Methanol bzw. 1:1 (V/V) mit Propylenglycol, als Imprägnierungsflüssigkeit bzw. Akzeptormedium. Die Akzeptormedien gewährleisteten "sink-Bedingungen"¹. Der pH Wert von 5,0 stellt für

¹Im Akzeptor gelöst vorliegendes MPA unterschreitet 10 % seiner Sättigungskonzentration

MPA ein Stabilitätsoptimum dar. Die Gehaltsbestimmung von MPA im Akzeptormedium erfolgte mittels HPLC (Gehaltsbestimmungen 4.3.10).

Für die Markierungsversuche gelangte ein BSA-Puffer (pH 7,4) zur Untersuchung, bestehend aus 0,041 M Dinatriumhydrogenphosphat, 0,026 M Kaliumdihydrogenphosphat, 0,154 M Natriumchlorid, 0,015 M Natriumazid und 0,1% (m/V) Rinderserumalbumin. Die Gehaltsbestimmung von ^3H -MPA wurde mit einem β -Szintillator durchgeführt (Untersuchungen an Maushaut 4.3.8).

Tabelle 3: Charakteristika der Membranen

Membran	Poren \varnothing [μm]	Membrandicke [μm]
Polyester, Nucleopore [®] (Costar, Tübingen)	5,0	10
Celluloseacetat (Sartorius, Göttingen)	0,2	150
Polycarbonat, Nucleopore [®] (Costar, Tübingen)	0,03	10
Regenerierte Cellulose, Cuprophan [®] (AKZO Faser AG, Wuppertal)	0,005	11 \pm 0,5

2.2.5 Ergebnisse und Diskussion

2.2.5.1 Membranvarianten

Die Liberationsergebnisse von MPA aus Advantan[®]-Fettsalbe durch verschiedene Membranen (Tabelle 3) unter Verwendung von Methanol / Phosphatpuffer sowohl als Akzeptor als auch zur Imprägnierung sind in Abb. 9 dargestellt. Die Abbildung zeigt für die Polycarbonat-Membran sehr hohe Startwerte, die durch einen "burst-effect" (Lösungseffekt) erklärt werden können [130]. Dieser Effekt tritt auf, wenn die Lösungsgeschwindigkeit des Arzneistoffs in einer Membran(-imprägnierung) höher ist als die Diffusionsgeschwindigkeit in der Formulierung. In diesem Fall reicht sich der Arzneistoff zunächst sehr schnell in der Membran an und gelangt schnell in den Akzeptor. Wie am Freisetzungsprofil zu erkennen, führt dieser Effekt, bedingt durch die hohe Initialfreisetzung, zu den höchsten Freisetzungsraten. Die Polyester-, Celluloseacetat- und Cuprophan-Membranen zeigen anfänglich deutlich niedrigere Freisetzungsraten. Die Cuprophan-Membran stellt, verglichen mit der Polyester- und Celluloseacetat-Membran, die schwächste Diffusionsbarriere dar und verursacht keinen

"burst-effect". Für sie berechnet sich die höchste Freisetzungsrates (p=0,05, entsprechend t-Test innerhalb der Freisetzungsprofile, Tabelle 4).

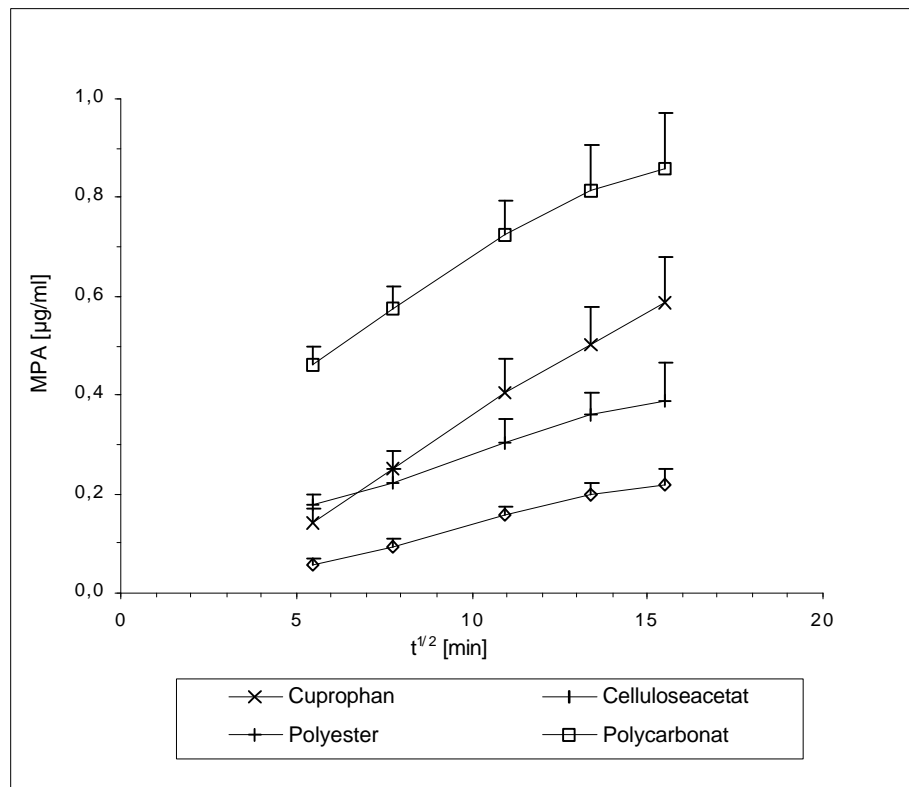


Abb. 9 In-vitro-Freisetzung von Methylprednisolonacetat (MPA) aus Advantan®-Fettsalbe durch verschiedene Membranen unter Verwendung von Methanol / Phosphatpuffer sowohl als Akzeptormedium als auch zur Imprägnierung, n=3, R²>0,99

Tabelle 4: Freisetzungsrates von MPA durch synthetische Membranen in Abhängigkeit von Imprägnierung und Akzeptormedium

Membran	Imprägnierung	Akzeptormedium	Freisetzungsrates [µg/ml/min*10 ⁻³]
Polycarbonat	MeOH / PhP	MeOH / PhP	40,3 ± 8,9
Polycarbonat	PVP	MeOH / PhP	34,8 ± 8,4
Cuprophane	PG / PhP	PG / PhP	22,0 ± 7,8
Polyester	MeOH / PhP	MeOH / PhP	22,0 ± 4,9
Celluloseacetat	MeOH / PhP	MeOH / PhP	16,6 ± 1,8
Cuprophane	MeOH / PhP	MeOH / PhP	42,8 ± 6,6
ohne Membran	-	MeOH / PhP	36,9 ± 5,8

PVP	Polyvinylpyrrolidon	PG	Propylenglycol
PhP	Phosphatpuffer	MeOH	Methanol

Die Liberation von MPA aus Advantan[®]-Fettsalbe durch die Cuprophan-Membran und die Polycarbonat-Membran unter Nutzung verschiedener Imprägnierungen und von zwei Akzeptormedien gibt Abb. 10 wieder. Die ermittelten Freisetzungsraten sind in Tabelle 4 enthalten.

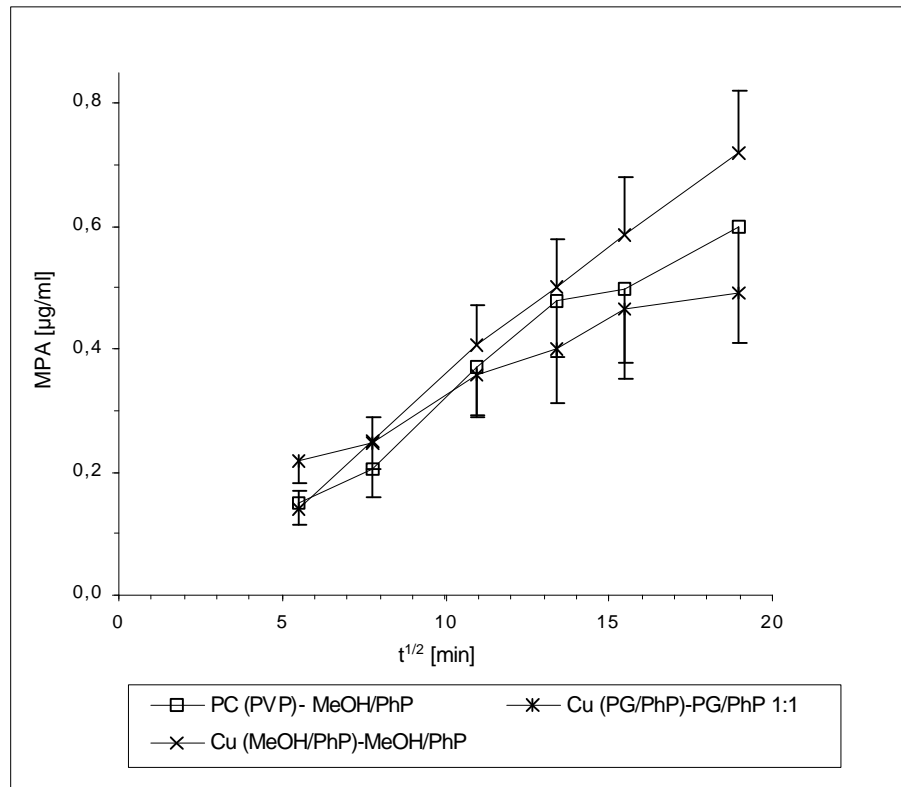


Abb. 10: In-vitro-Freisetzung von Methylprednisolonacetat (MPA) aus Advantan[®]-Fettsalbe. Imprägnierung: mit Klammern, Akzeptor-medium: ohne Klammern. (PVP): 5%ige Lsg. Polyvinylpyrrolidon, (PhP/PG): Phosphatpuffer / Propylenglycol, (MeOH/PhP): Methanol / Phosphatpuffer

Die mit den hydrophilen Flüssigkeiten 5%ige PVP-Lösung bzw. Propylenglycol / Phosphatpuffer imprägnierten Polycarbonat- bzw. Cuprophan-Membranen zeigen eine ähnliche membrankontrollierte Freisetzung für das Steroid wie die mit Methanol / Phosphatpuffer imprägnierte Cuprophan-Membran. Allerdings führen eine schlechtere Benetzbarkeit der Polycarbonat-Membranen nach PVP-Imprägnierung und die daraus resultierenden Probleme bei der Applikation der zu prüfenden Dermatika zu größeren Streuungen der Meßwerte. Auch die mit Propylenglycol / Phosphatpuffer imprägnierte Cuprophan-Membran besitzt ungünstigere Eigenschaften beim "handling" in

bezug auf das Glätten der Membran und die Haftung der Vehikel gegenüber der mit Methanol / Phosphatpuffer imprägnierten Cuprophon-Membran.

Abb. 11 gibt die Liberation von MPA aus Advantan-Fettsalbe durch die Cuprophon- und Polycarbonat-Membran nach Imprägnierung mit IPM, durch die mit Methanol / Phosphatpuffer imprägnierte Cuprophon-Membran sowie die Liberation ohne Membran wieder.

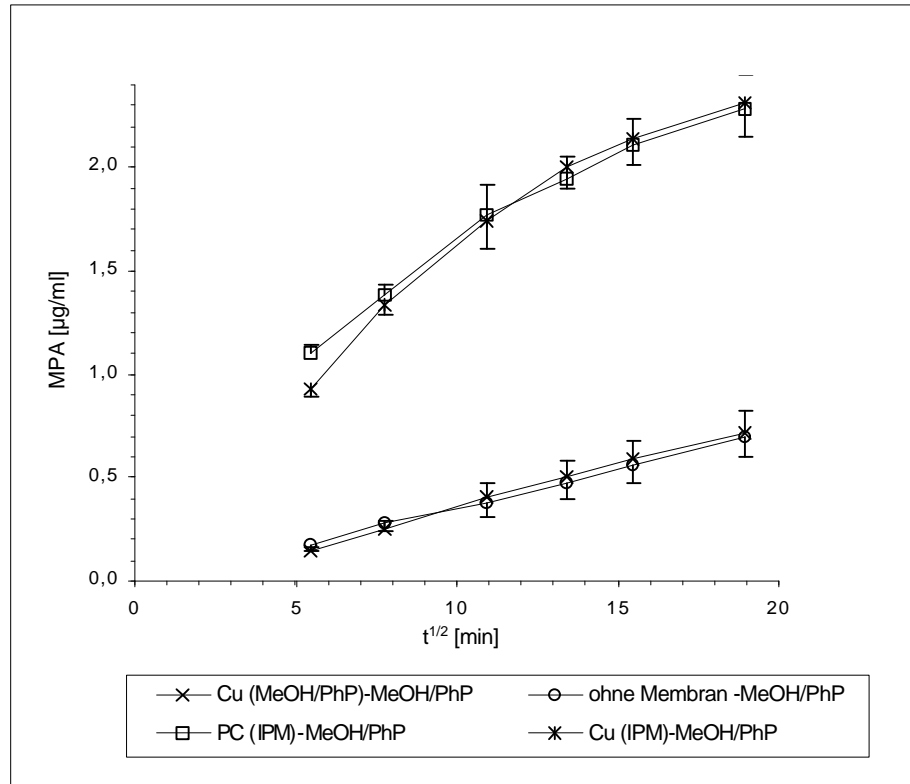


Abb. 11: In-vitro-Freisetzung von Methylprednisolonacetat (MPA) aus Advantan-Fettsalbe durch die Polycarbonat- und Cuprophon-Membran sowie ohne Membran, (Imprägnierung in Klammern, Akzeptormedium ohne Klammern), Isopropylmyristat (IPM), Methanol/Phosphatpuffer (MeOH/PhP)

Die besseren Lösungseigenschaften für Steroide in IPM führen zu einem ausgeprägten "burst-effect", der die Differenzierung der Freisetzungsdaten verschiedener Zubereitungen schwer erlaubt. Beide Membranen zeigen, mit IPM getränkt, identische Freisetzungprofile ($P=0,05$); sie unterliegen keiner matrixkontrollierten Freisetzung. Bemerkenswerterweise hat das *Office of Generic Drugs (Department der FDA)* IPM als geeignete Imprägnierung für Celluloseacetat oder -nitrat-Membranen zur Beschleunigung der Freisetzung von Corticosteroiden aus Salbengrundlagen vorgeschlagen [10].

Die Liberation ohne Membran zeigt gleiches Freisetzungsverhalten wie die mit Methanol / Phosphatpuffer imprägnierte Cuprophan-Membran ($P < 0,05$). Die Untersuchungen ohne Membran waren mit Advantan-Fettsalbe aufgrund einer homogenen glatten Grenzfläche zwischen Donator und Akzeptor möglich.

Die Cuprophan-Membran, hydrophil getränkt mit Methanol / Phosphatpuffer, erfüllt die Maßgabe einer matrixkontrollierten Freisetzung, besitzt hinreichende Lösungseigenschaften für die gewählte Modellsubstanz MPA und zeigt keinen nennenswerten Einfluß auf deren Liberation. Sie ist somit geeignet für In-vitro-Liberationsuntersuchungen an entsprechenden dermalen Topika und wurde im folgenden für die Untersuchungen an verschiedenen Vehikeln der Advantan-Reihe ausgewählt. Die Cuprophan-Membran wird auch in der USP XXIII [131] als synthetische Membran für transdermale Freisetzungssysteme vorgeschlagen.

2.2.5.2 Vehikelvarianten

Die Freisetzungsprofile von MPA aus Advantan-Fettsalbe, -Salbe und -Creme im etablierten In-vitro-Liberationsmodell (vgl. Abschnitt 4.2) unter den optimierten Bedingungen zeigt Abb. 12.

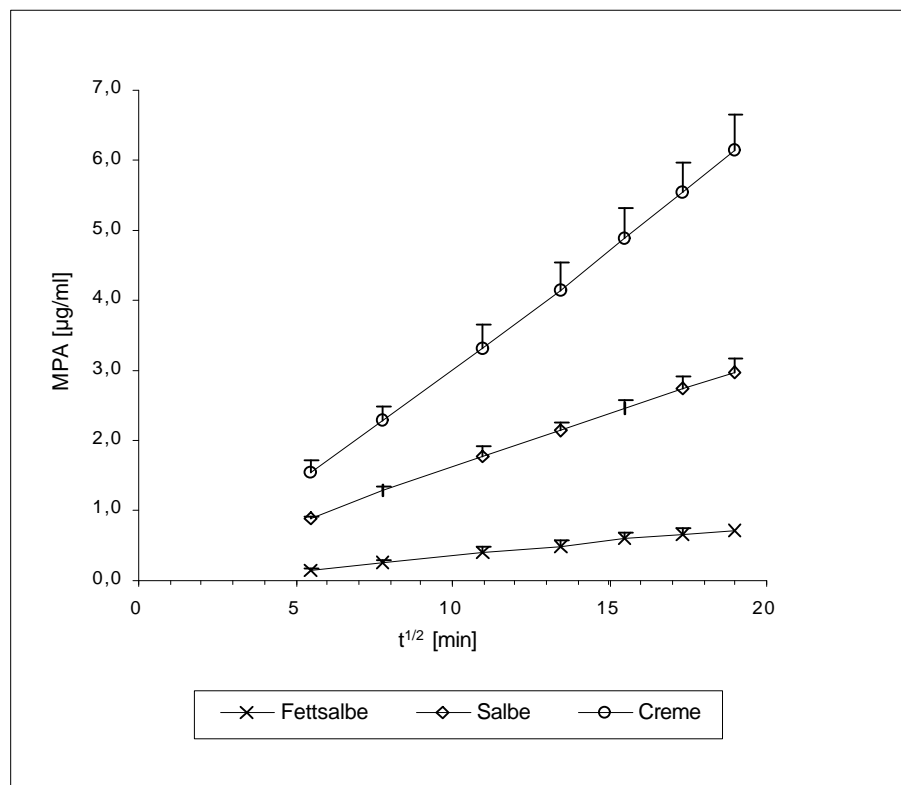


Abb. 12: In-vitro-Freisetzungsprofile von MPA aus Advantan-Fettsalbe, -Salbe, und -Creme durch die Cuprophane-Membran unter Verwendung von Methanol / Phosphatpuffer sowohl als Akzeptormedium als auch zur Imprägnierung, n=6, P=0,05, $R^2 > 0,99$

Die Freisetzungsrate nimmt in der Reihenfolge Creme > Salbe > Fettsalbe deutlich ab (Tabelle 5).

Tabelle 5: Freisetzungsrate von MPA durch die Cuprophane-Membran, imprägniert mit Methanol / Phosphatpuffer (1:1, V/V) aus Advantan-Fettsalbe, -Salbe, und -Creme

Vehikel	Freisetzungsrate [$\mu\text{g}/\text{ml}/\text{min} \cdot 10^{-3}$]
Fettsalbe	$42,8 \pm 6,6$
Salbe	$154,0 \pm 10,9$
Creme	$341,1 \pm 24,3$

Die Freisetzungscharakteristik des Wirkstoffs hängt u.a. von seinem Konzentrationsprofil und der Löslichkeit des Wirkstoffs im Vehikel ab. Während MPA in der Creme-Zubereitung hauptsächlich in Ölsäuredecylester (Cetiol V) gelöst ist, liegt das Steroid in Kohlenwasserstoffgrundlagen (Advantan-Fettsalbe, -Salbe) fast vollständig suspendiert vor. In der Salben-Zubereitung ist möglicherweise ein kleiner Anteil MPA im Emulgator (Dehymuls® E) gelöst.

Unter bestimmten Voraussetzungen können ungelöste Wirkstoffanteile den limitierenden Faktor für die Freigabe des Wirkstoffs darstellen. Während vollständig gelöster Wirkstoff primär diffusionskontrolliert freigesetzt wird, können im Falle suspendierten Wirkstoffs vorgeschaltete Lösungsvorgänge die Freigabe des Wirkstoffs in Salben verlangsamen [1].

Wesentlich für die Beeinflussung der Freisetzung ist ferner die Viskosität des Vehikels (Diffusionswege). Die Viskosität der Advantan-Vehikel nimmt in der Reihenfolge Creme < Salbe < Fettsalbe, entsprechend den abnehmenden Freisetzungsrate, zu (Tabelle 6).

Die rheologischen Untersuchungen der drei Dermatika wurden mittels Rotationsviskosimeter (Couette-Prinzip) durchgeführt (Rheologische Untersuchungen, 4.3.15). Als Berechnungsgrundlage für die erhobenen rheologischen Daten diente das

Regressionsmodell nach Ostwald [132], welches aufgrund der höchsten Korrelationskoeffizienten zwischen verschiedenen Modellen ausgewählt wurde. Fettsalbe und Salbe weisen im gewählten Meßbereich bei zunehmender Schubspannung eine abnehmende scheinbare Viskosität auf und können mit sehr unscharfer Fließgrenze als plastische Körper charakterisiert werden. Die Creme zeigt deutliches Fließverhalten erst nach Überschreiten einer minimalen Schubspannung. Bei weiterer Zunahme der Schergeschwindigkeit nimmt allerdings die Schubspannung ab, d.h. die Viskosität nimmt ab. Dieses Fließverhalten ist untypisch für Cassonplastisches und Binghamplastisches Verhalten. Im Hinblick auf den mathematischen Zusammenhang zwischen Schubspannung und Schergeschwindigkeit im Regressionsmodell nach Ostwald (Gleichung 5) zeigt sich die zunehmende Viskosität in der Reihenfolge Creme < Salbe < Fettsalbe deutlich.

Tabelle 6: Rheologische Daten von Advantan-Fettsalbe, -Salbe und -Creme

Vehikel	Fluiditätsfaktor	Fließexponent	Korrelationskoeffizient r
Fettsalbe	302	0,21	0,987
Salbe	94	0,37	0,981
Creme	440	- 0,14	0,826

Gleichung 5 Regressionsmodell nach Ostwald [132,133]

$\tau = K * D^{\eta}$	<p>τ: Schubspannung [Pa] D: Schergeschwindigkeit [s^{-1}] K: Fluiditätsfaktor η: Pseudoplastizitätsfaktor (Fließexponent)</p>
-----------------------	---

2.2.5.3 In vitro-Permeation durch Maushaut

Die Permeation von 3H -MPA aus Advantan-Fettsalbe, -Salbe und -Lösung durch haarlose *intakte* Maushaut gibt Abb. 13 wieder. Die Permeationsrate nimmt in der Reihenfolge Lösung > Salbe > Fettsalbe ab ($P=0,05$). In ihrer Rangordnung lassen sich

die Freisetzungsprofile der verschiedenen Advantan-Zubereitungen mit den Ergebnissen der In-vitro-Liberationsuntersuchungen vergleichen.

Obwohl ausschließlich Haut von haarlosen gleichgeschlechtlichen Mäusen gleichen Alters und identischer Provenienz verwendet wurde, ist die Streuung der experimentellen Ergebnisse sehr hoch. Die Variationskoeffizienten der gemessenen Radioaktivität in der Akzeptorphase waren anfänglich am höchsten und lagen nach 6 Stunden noch bei 40 %.

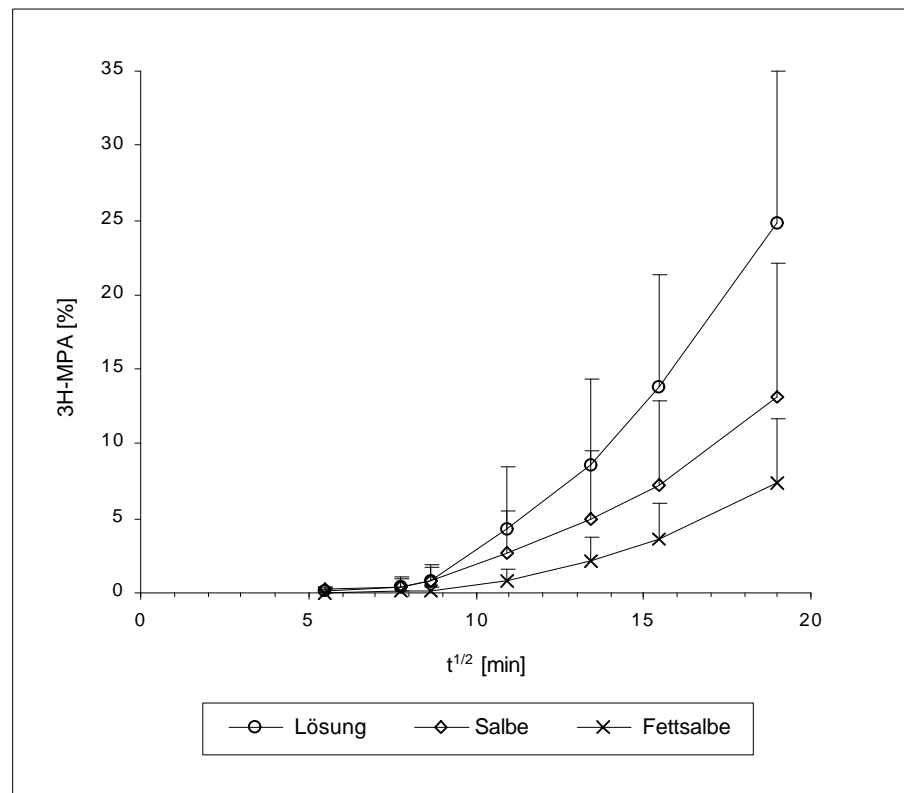


Abb. 13: In-vitro-Freisetzungsprofile (*intakte Maushaut*) von ^3H -Methylprednisolon-aceponat (^3H -MPA) aus Advantan-Fettsalbe, -Salbe und Lösung, BSA-Puffer als Akzeptormedium

Die Zeitkurven der Permeation, gemessen als Radioaktivität, durch die *gestrippte* Maushaut in das Akzeptormedium sind in Abb. 14 dargestellt. Sie sind für alle drei Formulierungen nicht differenzierbar ($P > 0,05$). Die starke Streuung der experimentellen Daten läßt keinen Schluß auf einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Freisetzungsraten der drei Formulierungen zu.

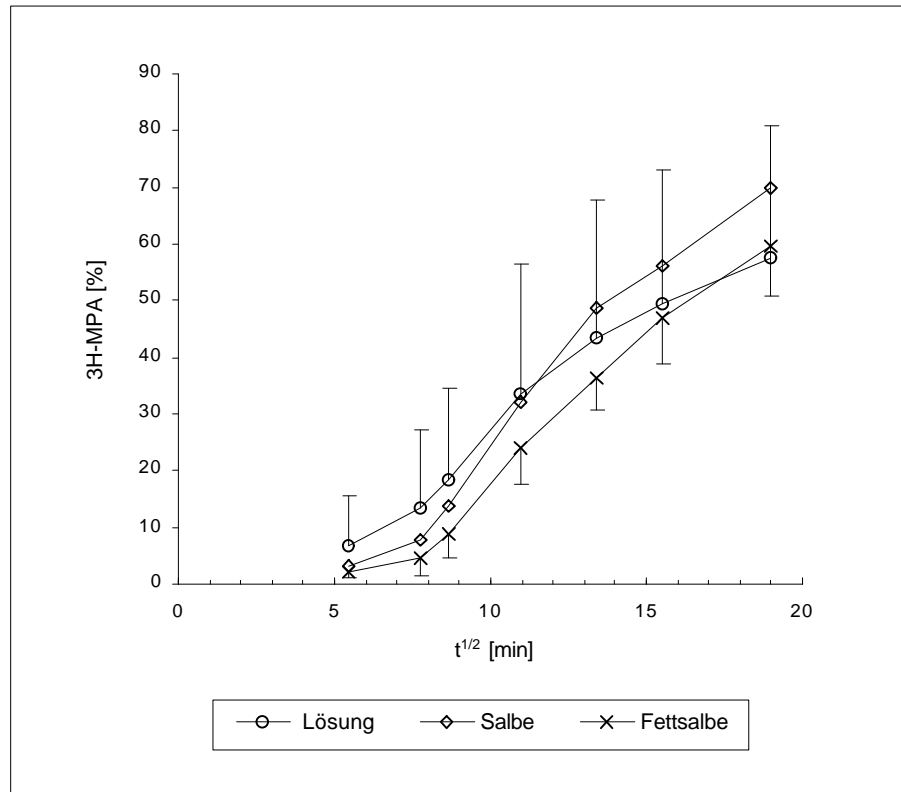


Abb. 14: In-vitro-Freisetzungsprofile (*gestrippte Maushaut*) von ^3H -Methylprednisolonaceponat (^3H -MPA) aus Advantan-Fettsalbe, -Salbe und Lösung, BSA-Puffer als Akzeptormedium

2.2.5.4 Zusammenfassung

Die vorgestellte In-vitro-Liberationsmethode für Dermatika wurde für die Unterscheidung der Freisetzung von Methylprednisolonaceponat (MPA) aus verschiedenen Vehikeln eingesetzt. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der experimentellen Daten ($P < 0,05$), läßt die Methode Unterschiede im Freisetzungsverhalten von Wirkstoffen sichtbar werden. Sie besitzt Vorteile gegenüber In-vitro-"screening"-Untersuchungen mit haarloser Maushaut, da diese ein hohes Streuungsmaß aufweisen, deshalb einen höheren Stichprobenumfang bedingen und kaum Differenzierungen zulassen [134].

Für spätere Untersuchungen an noch niedriger dosierten Dermatika soll ein größer dimensioniertes Franz-Diffusionszellsystem eingesetzt werden, um durch ein günstigeres Verhältnis zwischen Membranfläche und Akzeptorvolumen sowie eine verbesserte Proben-Applikationstechnik die Empfindlichkeit der Methode weiter zu erhöhen und damit für geringere Freisetzungsraten zu optimieren. Ziel ist es, diese Methode für

diskriminierende Untersuchungen für die Freisetzung von CA-Cyclodextrin-Assoziaten aus Dermatika heranzuziehen.

Vier synthetische Membranen, verschiedene Imprägnierungsmittel sowie Akzeptormedien wurden getestet. Eine Cuprophan-Membran, imprägniert mit dem Akzeptormedium Methanol/Phosphatpuffer {1:1} (pH 5,0), erwies sich als besonders geeignet. Die erzielten Freisetzungsprofile für Advantan-Fettsalbe, -Salbe und -Creme bzw. -Lösung entsprechen in ihrer Rangordnung den in In-vitro-Versuchen an haarloser intakter Maushaut ermittelten Ergebnissen. Die erprobte Methode liefert reproduzierbare Resultate mit geringen Varianzen und eignet sich auch zur Beurteilung der Arzneimittelqualität in der Entwicklung und Optimierung entsprechender kutaner Arzneiformen.

2.3 Einschlußverbindungen des Vitamin-D₃-Analogon mit β -Cyclodextrin-Derivaten

2.3.1 Theoretische Betrachtungen zum Vitamin-D₃-Analogon / β -Cyclodextrin-Assoziat

Neben den experimentellen Versuchen wurden mit Hilfe einer Computersimulation am Beispiel des CA / β -CD-Assoziates theoretische Betrachtungen vorgenommen.

Solche Molecular Modelling-Methoden zur Berechnung und graphischen Darstellung der Moleküle und Moleküleigenschaften kommen zur Anwendung, um einen Einblick in mögliche geometrische Verhältnisse einer Einschlußverbindung zu erhalten. Diese Untersuchungen dienen auch der Abschätzung der räumlichen Kompatibilität des Calcitriol-Analogon-Moleküls mit dem Hohlraum eines β -CD.

Die Annäherung des Gastmoleküls (Ligand) an das β -CD und damit die molekulare Erkennung stellt einen wichtigen Schritt der Komplexbildung dar. Der Ligand ist bestrebt, sich an attraktive Bindungsstellen des β -CD anzulagern. Aufgrund der komplexen Struktur des Oligosaccharids und der damit verbundenen Vielzahl von theoretisch möglichen Bindungsstellen ist es nahezu unmöglich, durch willkürliches Positionieren des Liganden zufällig eine sinnvolle Komplexgeometrie zu erhalten.

Eine wertvolle Hilfestellung bei der Ermittlung intermolekularer Wechselwirkung bietet das Softwareprogramm GRID [135]. GRID ist ein kommerzielles Programm, das zur Berechnung und Visualisierung molekularer Interaktionsfelder entwickelt wurde [136]. Zur Ermittlung der Wechselwirkungsbereiche wird um das Molekül ein dreidimensionales Gitterraster gelegt. Die Interaktionsfelder werden durch Berechnung der intermolekularen Wechselwirkungsenergie zwischen dem Molekül und einer vordefinierten chemischen Probe an jedem Gitterpunkt des Rasters bestimmt. Attraktive Bindungsstellen zeichnen sich dabei durch negative Energiewerte aus, während abstoßende Wechselwirkungen positive Energiebeträge aufweisen.

Innerhalb des Programms steht dem Benutzer eine Auswahl von ca. 30 Proben zur Verfügung. Diese besitzen genau definierte Eigenschaften und sind durch van-der-

Waals-Radius, Polarisierbarkeit, Ladung usw. charakterisiert. Die Auswahl der Probe bestimmt die physikochemischen Eigenschaften, die in dem zu untersuchenden Molekül analysiert werden können und richtet sich in der Regel nach den charakteristischen Eigenschaften des potentiellen, komplementären Bindungspartners. So dient eine Methylprobe zur Lokalisierung hydrophober Regionen, während eine Hydroxylprobe zur Entdeckung möglicher Bindungsstellen für Wasserstoffbrücken verwendet wird.

Die Berechnung der Wechselwirkungsenergien zwischen chemischer Probe und dem Molekül erfolgt an jedem Gitterpunkt mit Hilfe von Gleichung 6:

Gleichung 6

$$E_{\text{ges}} = E_{\text{vdw}} + E_{\text{elec}} + E_{\text{hb}}$$

E_{ges}	Gesamtwechselwirkungsenergie
E_{vdw}	van-der-Waals-Wechselwirkungsenergie
E_{elec}	elektrostatische Wechselwirkungsenergie
E_{hb}	Wechselwirkungsenergie durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken

Der Berechnung der Teilenergiebeträge liegen eine Reihe von Potentialtermen zugrunde, die in der Molecular Modelling-Software implementiert sind. Die berechneten Gesamt-Wechselwirkungsenergien können anschließend auf bestimmten Energieniveaus kontuiert werden. Durch Verbindung von Gitterpunkten gleicher Energie erhält man dreidimensionale GRID-Felder, die zusammen mit dem Molekül auf Graphikbildschirmen visualisiert und analysiert werden können. Die Auswertung dieser Felder liefert eine detaillierte Beschreibung attraktiver Raumsegmente für die Probe und das Molekül. Die Zuverlässigkeit des Programms zur Ermittlung energetisch günstiger Wechselwirkungsbereiche in Molekülen konnte in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden [137, 138,139].

Zur Untersuchung von realistischen Wechselwirkungen innerhalb des Komplexes von Molekülen benötigt man möglichst genaue Angaben über die räumliche Geometrie der einzelnen Moleküle. Energetisch günstige Konformationen der Kristallstrukturen konnten aus einer Datenbank herausgesucht werden (Cambridge Structural Database). Im Falle des CA wurde die Struktur des Vitamin D₃ zugrunde gelegt. Anschließend wurde das CA gebildet (Seitenkette verändert) und erneut einer Konformationsanalyse unterzogen.

Zur Berechnung der GRID-Interaktionsfelder des CA / β -CD-Assoziates wurden für das β -CD eine aliphatische Hydroxyl- und Methylprobe sowie eine Ethersauerstoffprobe ausgewählt, um günstige Wechselwirkungsbereiche für die funktionellen Gruppen des CA zu ermitteln. Umgekehrt wurden die Felder des CA mit den Proben berechnet. Damit war es möglich, Wechselwirkungsbereiche sowohl für van-der-Waals-Wechselwirkungen als auch für potentielle Wasserstoffbrücken zu bestimmen und zu lokalisieren.

Abb. 15, Abb. 16 und Abb. 17 zeigen die ermittelten GRID-Felder für das CA und das native β -CD in ausgewählten energetisch günstigen Konformationen.

Die GRID-Berechnungen der Ethersauerstoffprobe und der Hydroxylprobe in Abb. 15 zeigen die Möglichkeit des CA, mit Arealen für potentielle Wasserstoffbrückenbindungen des β -CD Wechselwirkungen einzugehen. Erwartungsgemäß sind die dargestellten Wechselwirkungsbereiche in den Regionen vorhandener Hydroxyl-Gruppen (A-Ring) sowie in der Seitenkette (Esterstruktur) besonders ausgeprägt (Calcitriol-Analogen 2.1.2). In Abhängigkeit sterischer Hinderung weisen die Wechselwirkungen unterschiedlich große Ausdehnungen auf. Die Berechnungen mit der Methylprobe, dargestellt in Abb. 16, zeigen mögliche Positionen, mit hydrophoben Bindungsarealen des β -CD in Wechselwirkung zu treten. Je nach Raumposition stellen sich die GRID-Felder der möglichen, besonders günstigen van-der-Waals-Wechselwirkungen unterschiedlich groß dar.

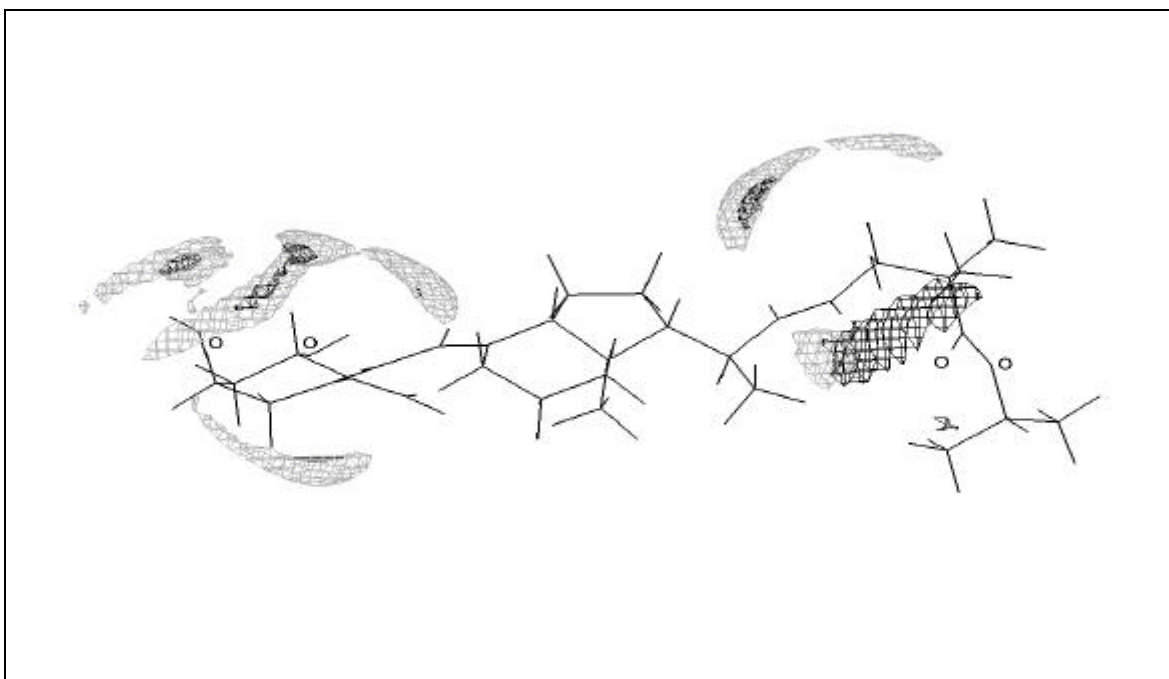


Abb. 15: Calcitriol-Analogon: GRID-Interaktionsfelder unter Verwendung einer aliphatischen Hydroxylprobe (dunkel gezeichnet) und einer Ethersauerstoffprobe (hell gezeichnet)

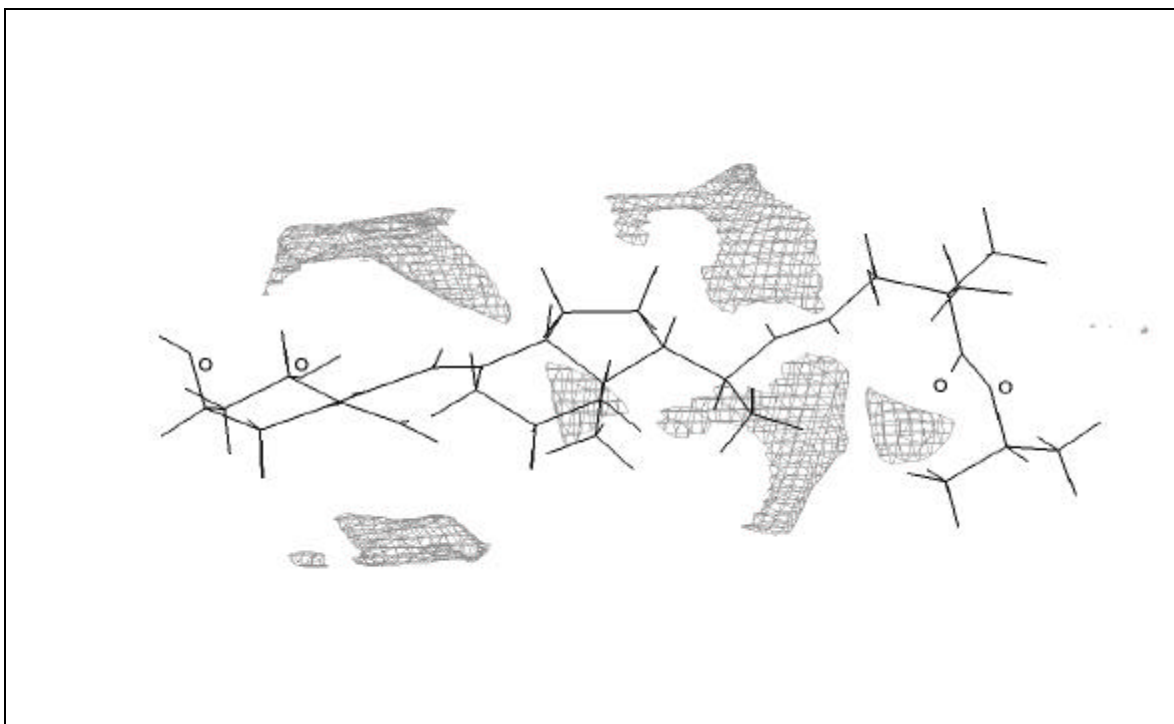


Abb. 16: Calcitriol-Analogon: GRID-Interaktionsfelder unter Verwendung einer Methylprobe (hell)

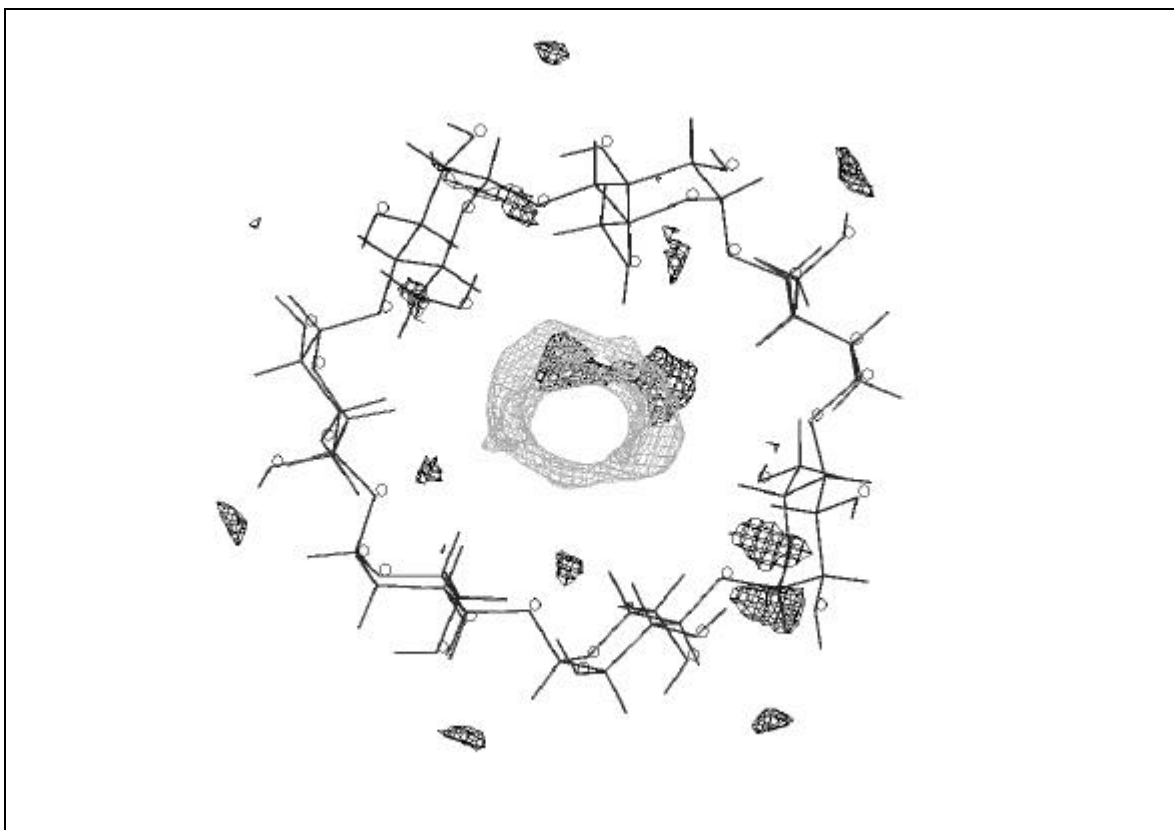


Abb. 17: β -CD: GRID-Interaktionsfelder unter Verwendung einer aliphatischen Hydroxylprobe (dunkel gezeichnet) und einer Methylprobe (hell gezeichnet)

Abb. 17 verdeutlicht die GRID-Interaktionsfelder für eine ausgewählte Konformation des β -CD unter Verwendung einer aliphatischen Hydroxylprobe wie sie im CA-Molekül vorkommt. Ebenfalls werden Interaktionen mit einer Methylprobe berechnet. Maximale Wechselwirkungsenergien zeigen sich im Hohlraum des β -CD. Hier sind starke van-der-Waals-Wechselwirkungen mit hydrophoben Strukturen des Gastmoleküls zu postulieren. Die dunkler gezeichneten Interaktionsfelder zeigen Bereiche für einen potentiellen Wasserstoffbrückendonator. Obwohl im β -CD-Molekül eine Vielzahl an Ethersauerstoffatomen prinzipiell als Akzeptor für Wasserstoffbrücken fungieren kann, sind sie in dieser Konformation nicht alle gleichermaßen in der Lage, eine optimale Wechselwirkung einzugehen. Die Auffindung dieser räumlich getrennten Areale ist mit Hilfe der GRID-Berechnungen möglich. Es läßt sich in den drei Abbildungen gut erkennen, daß komplementäre Wechselwirkungen innerhalb eines Assoziats zwischen dem CA und dem β -CD-Molekül eingegangen werden können.

Die Ergebnisse dieser theoretischen Betrachtungen lassen auf die Möglichkeit einer echten Einschlußverbindung schließen. Vorstellbar sind einerseits Einschüsse der Partialstruktur des A-Ringes des CA-Moleküls in den Hohlraum eines β -CD-Moleküls. Andererseits ist ein Einschluß der Esterseitenkette des Secosteroids ebenso plausibel. Diesen Betrachtungen zufolge müßte die Bildung eines 2:1-Komplexes möglich sein. Die Bildung von 2:1-Komplexen von Vitamin D₃ und β -CD wurde von Szejtli et al. [75] mit ¹³C-NMR Spektren bereits postuliert.

2.3.2 Untersuchungen

Sechs wasserlösliche β -Cyclodextrin-Typen (Tabelle 3) gelangten als Komplexbildner für das CA in die Untersuchungen. Die Herstellung möglicher Kavitate erfolgte nach verschiedenen Verfahren (Herstellung fester Kavitate, 4.3.3):

- β -Cyclodextrin (β -CD)
- 1.8-Dimethyl- β -cyclodextrin (Dimeb)
- β -Cyclodextrin-Polymer (β -CD-Polymer)
- Maltosyl- β -cyclodextrin (G₂- β -CD)
- Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD)
- Carboxyethyl- β -cyclodextrin (CE- β -CD)

Die Charakterisierung der Reaktionsprodukte erfolgte mit Hilfe verschiedener physiko-chemischer Verfahren: Der Erfolg des Einschlusses wurde mittels Differential Scanning Calorimetry (DSC) beurteilt. Am Beispiel des β -CD erfolgten zur Veranschaulichung thermischer Effekte thermomikroskopische Aufnahmen von der physikalischen Mischung und dem Kavitat. Durch Aufnahme von Phasenlöslichkeitsdiagrammen und anschließender Berechnung der Komplexstabilitätskonstanten wurden die sechs CD-Systeme in Lösung charakterisiert. Des weiteren dienten ^1H -NMR-Untersuchungen an den Systemen CA / β -CD und CA / Dimeb zur eventuellen Strukturaufklärung.

Die CA-Gehaltsbestimmung in den festen Kavitationen erfolgte hochdruckflüssigkeits-chromatographisch.

2.3.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.3.1 Herstellung der Kavitate

Die Auswahl des Herstellungsverfahrens ist von den Lösungseigenschaften beider Komponenten abhängig. Soll ein fester CD-Einschluß mit der Kopräzipitationsmethode hergestellt werden, darf die Einschlußverbindung nur begrenzt in Wasser löslich sein. Wenn die Löslichkeit der Gastkomponente in Wasser zu gering ist, werden heißes Wasser oder Alkohol/Wasser-Mischungen verwendet. CD-Einschlußverbindungen mit hoher Wasserlöslichkeit können mit der Knetmethode, Sprühtrocknung oder Gefrier-trocknung hergestellt werden. Während ein CA / β -CD-Einschluß nach der Kopräzipi-tationsmethode hergestellt werden kann, müssen die höher wasserlöslichen Derivate dagegen nach anderen Verfahren hergestellt werden.

Die Herstellung des Einschlüsse vom CA mit nativem β -CD erfolgte mittels Kopräzipi-tation. Für die Herstellung von Einschlüssen mit β -Cyclodextrin-Derivaten gelangten die Lyophilisation und die Knetmethode zum Einsatz (Herstellung fester Kavitate 4.3.3). Da gefriergetrocknete CA amorphen Charakter aufweist, werden die DSC-Untersuchungen nur an Knetprodukten durchgeführt.

2.3.3.2 Charakterisierung der Calcitriol-Analogon / β -Cyclodextrin-Assoziat

2.3.3.2.1 Phasenlöslichkeitsdiagramme

Das Phasenlöslichkeitsdiagramm dient als Methode zur Interpretation einer Einschlussbildung in wässriger Lösung. Es gibt Auskunft über die Löslichkeit des Wirkstoff / Cyclodextrin-Assoziats und erlaubt die Berechnung einer scheinbaren Komplexstabilitätskonstanten (Charakterisierung von Kavitäten, 2.1.3.4). Die Durchführung der Phasenlöslichkeitsuntersuchungen erfolgte analog der Beschreibung im Experimentellen Teil (Phasenlöslichkeitsuntersuchungen, 4.3.13).

β -Cyclodextrin (β -CD)

Das Ergebnis der Untersuchung der Phasenlöslichkeit des CA / β -CD-Systems (Abb. 18) zeigt nach der Einteilung von Higuchi und Connors [114] einen B_S -Kurven-Typ. Es lässt sich am Kurvenmaximum die Sättigungskonzentration des Kavitats in Wasser ablesen. Im Bereich des abfallenden Astes errechnet sich ein Konzentrationsverhältnis CA / β -CD von ca. 1:200. Die Herstellung eines CA / β -CD-Kavits mittels Kopräzipitation ist somit in rein wässriger Lösung aufgrund der geringen Löslichkeit von CA ungeeignet. Durch Einsatz einer wässrig-alkoholischen Mischung als Lösungsmittel lässt sich aufgrund der besseren Löslichkeit des CA die Ausbeute an Komplex deutlich erhöhen (Herstellung fester Kavitate, 4.3.3).

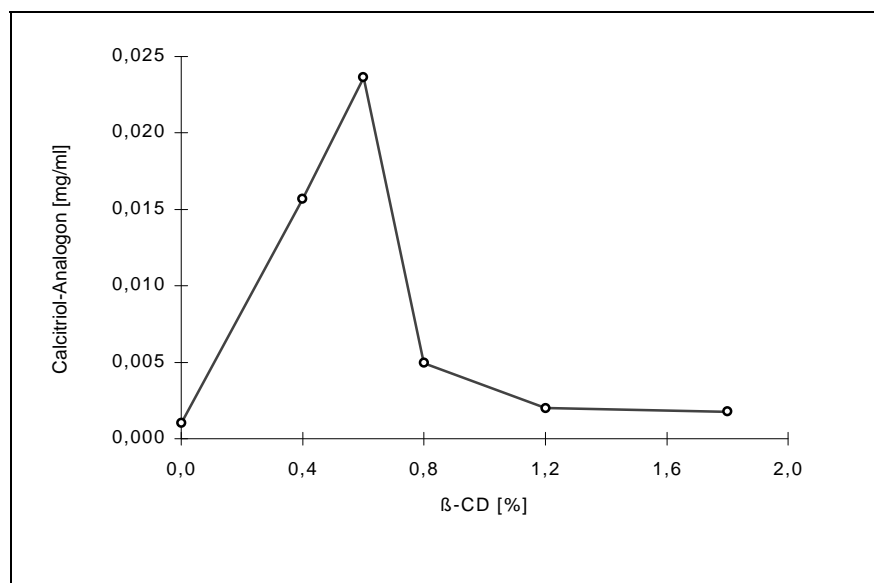


Abb. 18: Phasenlöslichkeitsdiagramm des Calcitriol-Analogon in wässriger β -CD-Lösung (pH=6,5) bei 25°C

1.8-Dimethyl- β -cyclodextrin (Dimeb)

Infolge der gegenüber nativem β -CD wesentlich besseren lösungsvermittelnden Eigenschaften von Dimeb ergeben sich mit Arzneistoffen in den meisten Fällen Löslichkeitsisothermen vom A_L-Typ [140]. Diese Kurvenform charakterisiert das Phasenlöslichkeitsdiagramm vom CA und Dimeb (Abb. 19).

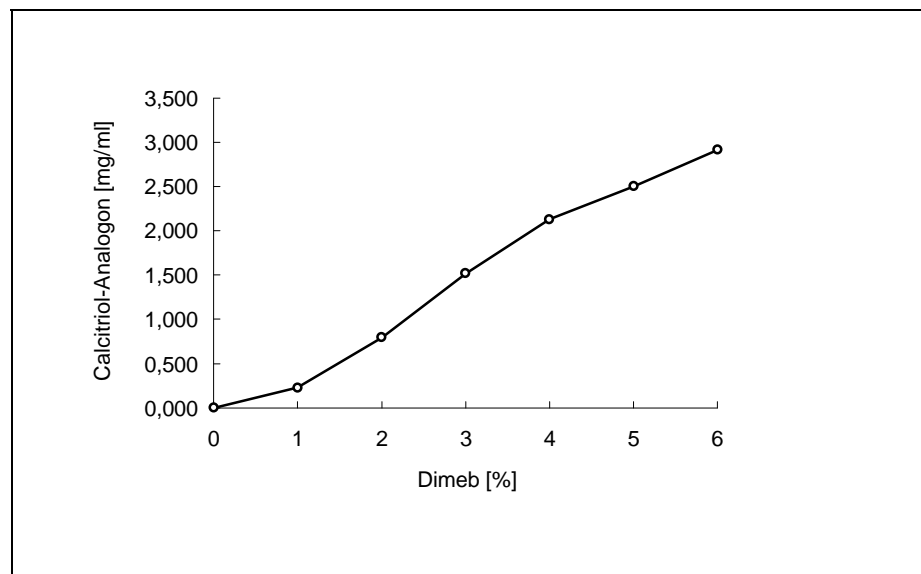


Abb. 19: Phasenlöslichkeitsdiagramm des Calcitriol-Analogon in wässriger Dimeb-Lösung (pH=6,5) bei 25°C

Es kommt zu einer linearen Erhöhung der Löslichkeit der Gastkomponente in Abhängigkeit von der Dimeb-Konzentration, ohne Ausfällung des Komplexes aus der wässrigen Lösung. Derartige lineare Lösungsisothermen bilden sich bei Konstanz der Stöchiometrie (2:1) des Kavitats über den gesamten Konzentrationsbereich. Feste Kavitate werden in diesem Fall deshalb oft mit der Knetmethode [141] aus organisch-wässrigen Systemen [142], durch Erwärmen der Lösung oder durch Entfernen des Lösungsmittels gewonnen [143].

Maltosyl- β -cyclodextrin (G_2 - β -CD)

Abb. 20 veranschaulicht den Kurvenverlauf als A_L -Typ im untersuchten Bereich bis 5 % G_2 - β -CD-Zusatz.

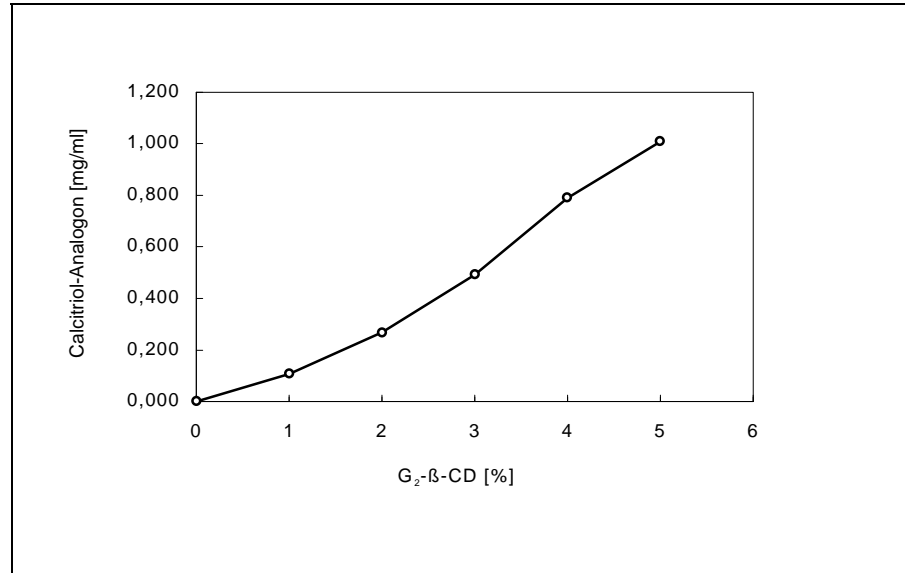


Abb. 20: Phasenlöslichkeitsdiagramm des Calcitriol-Analogon in wässriger G_2 - β -CD-Lösung (pH=6,5) bei 25°C

Vitamin D_2 und D_3 zeigen mit G_2 - β -CD [144] in Phasenlöslichkeitsuntersuchungen eine B_S -Typ-Löslichkeitskurve, allerdings erst im hochkonzentrierten Bereich des G_2 - β -CD (15%). Es ist nicht auszuschließen, daß das CA ein ähnliches Verhalten in hohen G_2 - β -CD Konzentrationen aufweist, was in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde.

 β -Cyclodextrin-Polymer (β -CD-Polymer)

Im untersuchten Konzentrationsbereich bis 6 % besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Gastmoleküls und des β -CD-Polymers (Abb. 21). Die Löslichkeitsisotherme läßt sich als A_L -Typ beschreiben.

2.3.3.2.2 Berechnung der Komplexstabilitätskonstanten

Die Berechnung der Komplexstabilitätskonstanten (Gleichung 1) erfolgte aus den Phasenlöslichkeitsdiagrammen mittels linearer Regression (Tabellenanhang, 5). Für das System CA / β -CD wurde der ansteigende Ast für die Berechnung herangezogen. Im Falle von β -CD-Polymer wurde von einem mittleren Molekülmasse von 4350 g/mol

ausgegangen. Die so erhaltenen Ergebnisse und Bestimmtheitsmaße sind Tabelle 7 zu entnehmen.

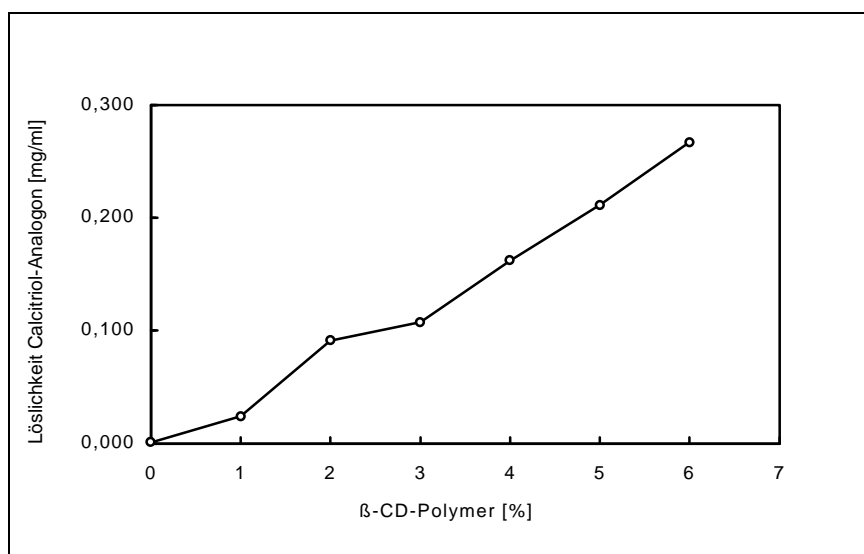


Abb. 21: Phasenlöslichkeitsdiagramm des Calcitriol-Analogon in wässriger β -CD-Polymer-Lösung (pH=6,5) bei 25°C

Tabelle 7: Komplexstabilitätskonstanten (K) der verschiedenen Komplexe in wässriger Lösung

System	K [l/mol]	Bestimmtheitsmaß R^2
CA / β -CD	37 989	0,99
CA / Dimeb	57 612	0,98
CA / G ₂ - β -CD	28 575	0,98
CA / β -CD-Polymer	17 715	0,98

2.3.3.2.3 Gehaltsbestimmung

Die quantitative Erfassung des CA in allen festen β -CD-Einschlußverbindungen erfolgte mittels Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC) unter UV-Detektion (Gehaltsbestimmungen, 4.3.10). Es gelangten gewaschene Produkte in die Untersuchungen. Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen von CA im festen Komplex sowie die daraus berechneten molaren Verhältnisse sind in Tabelle 8 gelistet. Die Gehaltsbestimmungen von CA in HP- β -CD und CE- β -CD ergaben keine reproduzierbaren Resultate.

Tabelle 8: Gehalt an CA und molare Verhältnisse

System	Gehalt an CA [%] n=3	Molares Verhältnis CA : β -Cyclodextrin
CA / β -CD	6,5	1:7
CA / Dimeb	16,1	1:2
CA / G ₂ - β -CD	6,3	1:5
CA / β -CD-Polymer	5,6	1:2

2.3.3.2.4 Differential Scanning Calorimetrie

Als Nachweismethode für das Vorliegen von Cyclodextrin-Komplexen in festem Zustand wird die Differential Scanning Calorimetry (DSC) herangezogen. Diese Methode basiert darauf, daß in den Thermogrammen von eingeschlossenen Arzneistoffen durch die „molekulare Verkapselung“ die Schmelzpunktpeaks, die bei reinen kristallinen Arzneistoffen und den entsprechenden physikalischen Mischungen detektiert werden können, ausbleiben (Charakterisierung von Kavitäten, 2.1.3.4). Die Messungen erfolgten gemäß der Beschreibung im Experimentellen Teil (4.3.11).

Da gefriergetrocknete CA-Substanz aufgrund ihrer amorphen Struktur im DSC-Thermogramm keinen Schmelzpunktpeak ausbildet, konnten die DSC-Untersuchungen nicht an Lyophilisaten vorgenommen werden. Dieses Phänomen wurde in einem Vorversuch ermittelt. Zur Untersuchung gelangten nur die Knetprodukte und Kopräzipitate.

β -Cyclodextrin (β -CD)

Abb. 22 zeigt die DSC-Thermogramme von CA / β -CD-Systemen. Entscheidend für den Nachweis der Komplexverbindung ist der Temperaturbereich, in dem die Verbindung schmilzt. Reines CA (a) bildet bei ca. 105°C einen endothermen Schmelzpunktpeak aus. Zusätzlich zeigt die Substanz eine höherschmelzende Modifikation bei ca. 122°C. Diese bildet sich möglicherweise nach längerer Lagerung bzw. durch Temperatureinfluß während der Messung. Bei ca. 60°C zeigt sich ein weiterer endothermer Vorgang durch Verlust der Restfeuchte des CA. β -CD (d) zeigt einen steilen Kurvenanstieg mit

ausgeprägter Auslenkung im Bereich um 90-100°C. Dieser endotherme Vorgang wird durch Wasseraustritt aus dem β -CD hervorgerufen und führt zu einer Überlagerung der thermischen Effekte im Schmelzpunkt vom CA in der physikalischen Mischung (b). Dadurch ist der CA-Peak im Thermogramm der physikalischen Mischung verdeckt. Durch molekulare Verkapselung des CA durch β -CD (c) bleiben die Schmelzpunktpeaks aus. Auch hier ist eine endotherme Auslenkung aufgrund von Wasseraustritt plausibel. Die Zersetzung von β -CD ab 270°C (Karamelisierung) ist in dieser Aufnahme nicht dargestellt.

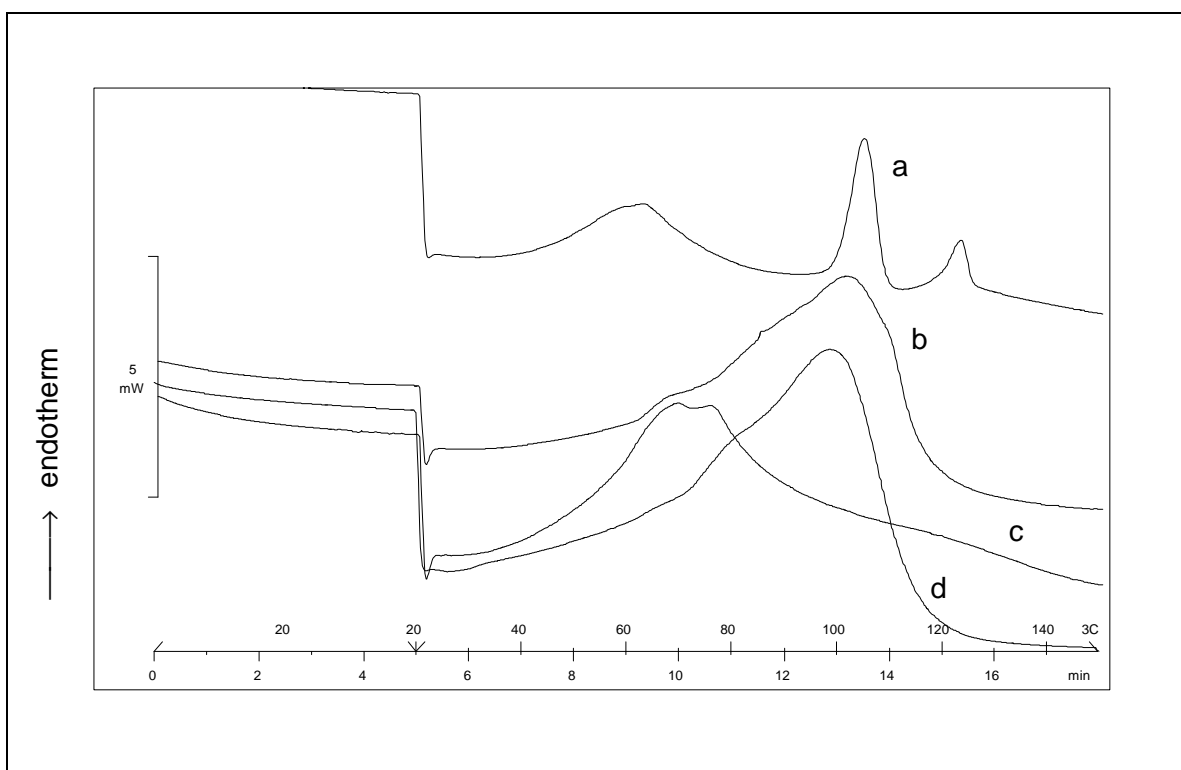


Abb. 22: DSC-Thermogramme von CA / β -CD-Systemen, a) reines CA, b) physikalische Mischung (1:7), c) Kopräzipitat (gewaschen), d) β -CD-Referenz

1.8-Dimethyl- β -cyclodextrin (Dimeb)

Abb. 23 zeigt die DSC-Thermogramme von CA / Dimeb-Systemen. Reines CA (a) bildet bei ca. 105°C einen endothermen Schmelzpunktpeak aus. Dimeb (e) zeigt als Referenzsubstanz einen stetigen Kurvenanstieg mit ausgeprägter Auslenkung im Bereich von 60-90°C. Dieser endotherme Vorgang wird durch Wasseraustritt aus Dimeb hervorgerufen (Trocknung).

Die Überlagerung der thermischen Effekte in der physikalischen Mischung (b) führt zu einem verminderten Schmelzpunktpeak des CA. Für den Einschluß des CA durch Dimeb (c und d) spricht das Ausbleiben des endothermen Schmelzpunktpeaks für CA, sowohl beim ungewaschenen als auch beim gewaschenen Kavitat.

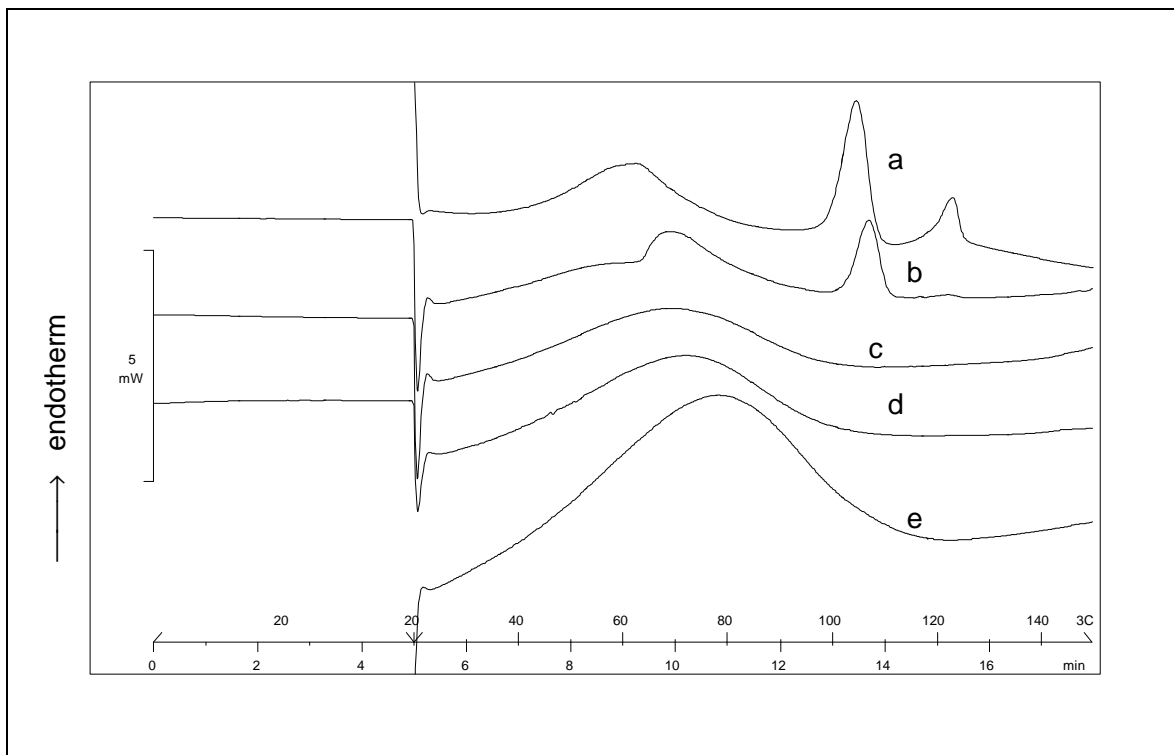


Abb. 23: DSC-Thermogramme von CA / Dimeb-Systemen, a) reines CA, b) physikalische Mischung (1:2), c) Knetprodukt (ungewaschen), d) Knetprodukt (gewaschen), e) Dimeb-Referenz

Maltosyl- β -cyclodextrin (G_2 - β -CD)

Abb. 24 zeigt die DSC-Thermogramme von CA / G_2 - β -CD-Systemen. Reines CA (a) bildet den bei ca. 105 °C erwarteten endothermen Schmelzpunktpeak aus. Als Referenzsubstanz zeigt G_2 - β -CD (e) einen bauchigen Kurvenverlauf im Bereich von 60-120 °C. Dieser endotherme Vorgang wird durch Wasseraustritt aus G_2 - β -CD hervorgerufen (Trocknung). Die physikalischen Mischung (b) zeigt den Schmelzpunktpeak des nicht eingeschlossenen CA's. Das Thermogramm des ungewaschenen Produktes (c) demonstriert, daß wahrscheinlich nur ein geringer Teil des CA eingeschlossen wird.

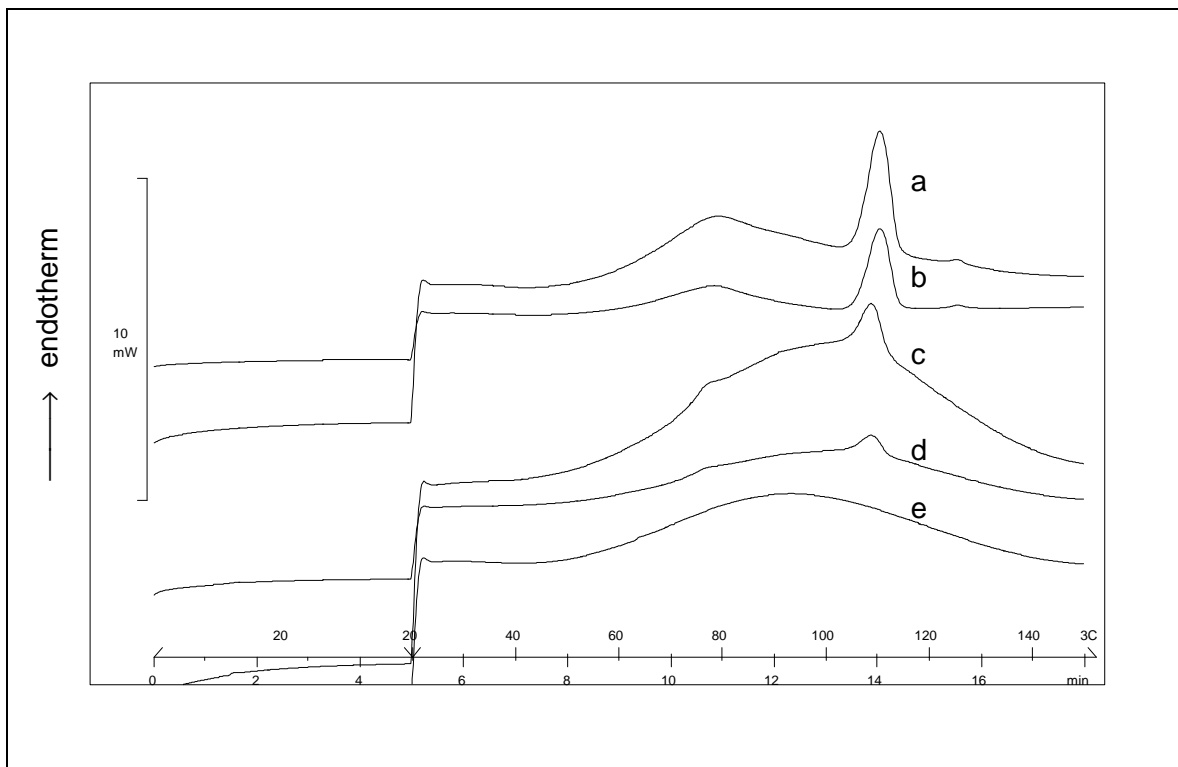


Abb. 24: DSC-Thermogramme von CA / G₂-β-CD-Systemen a) reines CA, b) physikalische Mischung (1:5), c) Knetprodukt (ungewaschen), d) Knetprodukt (gewaschen), e) G₂-β-CD-Referenz

β-Cyclodextrin-Polymer (β-CD-Polymer)

Abb. 25 stellt die DSC-Thermogramme der Einzelkomponenten, der physikalischen Mischung und des Knetprodukts aus Calcitriol-Analogon und Polymer-β-CD dar. Reines β-CD-Polymer (e) ergibt keinen Peak, sondern einen Kurvenverlauf mit ausgeprägter Auslenkung im Bereich von 60-100°C. Diese Erscheinung des Verdampfens von anhaftendem Wasser und Kristallwasser zeigt sich auch in den Thermogrammen der physikalischen Mischung und des Kavitats. Der Schmelzpeak des CA zeigt sich bei der physikalischen Mischung (b) deutlich, wenngleich abgeschwächt durch Überlagerung der Auslenkung durch den Wasserverlust aus dem β-CD-Polymer. Es tritt beim gewaschenen Knetprodukt (d) nur eine schwache Erhebung im Bereich des Schmelzpunktes des Gastmoleküls auf. Entweder ist das CA nicht quantitativ eingeschlossen worden oder anhaftende Gastkomponente konnte im Waschprozeß nicht vollständig vom Kavität entfernt werden.

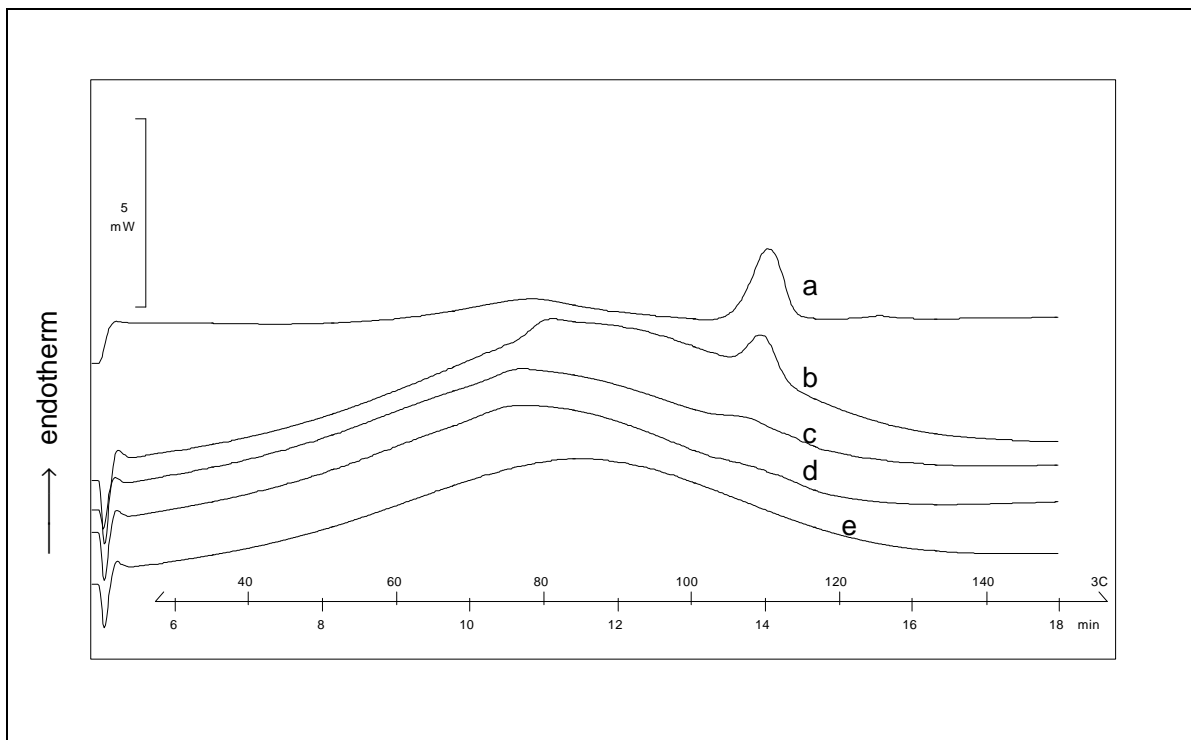


Abb. 25: DSC-Thermogramme von CA / β -Cyclodextrin-Polymer-Systemen (1:2), a) reines CA, b) physikalische Mischung, c) Knetprodukt (ungewaschen), d) Knetprodukt (gewaschen), e) β -CD-Polymer-Referenz

Carboxyethyl- β -cyclodextrin (CE- β -CD)

In Abb. 26 sind DSC-Thermogramme von CA / CE- β -CD-Systemen dargestellt. CE- β -CD (e) zeigt als Referenzsubstanz wiederum einen bauchigen Kurvenverlauf im Bereich von 60-120°C, welcher durch Wasseraustritt aus dem Cyclodextrinderivat hervorgerufen wird (Trocknung). Auffällig ist der nahezu identische Kurvenverlauf der physikalischen Mischung (b) und der des ungewaschenen Produkts (c). Vermutlich hat die Herstellmethode nicht zur Formation eines Kavitats geführt. Durch Waschprozesse (d) läßt sich teilweise CA aus dem Assoziat entfernen.

Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD)

In Abb. 27 sind DSC-Thermogramme von CA / HP- β -CD-Systemen dargestellt. Der CA-Referenzpeak (a) ist aufgrund einer höheren Einwaage ausgeprägter vorhanden. Wie schon beim CA / CE- β -CD-System beobachtet, ist davon auszugehen, daß die Herstellmethode für ein CA / HP- β -CD-System nicht zur Ausbildung eines Komplexes

geführt hat. Der Kurvenverlauf der physikalischen Mischung (b) zeigt nahezu den Verlauf des ungewaschenen und gewaschenen Produktes (c und d).

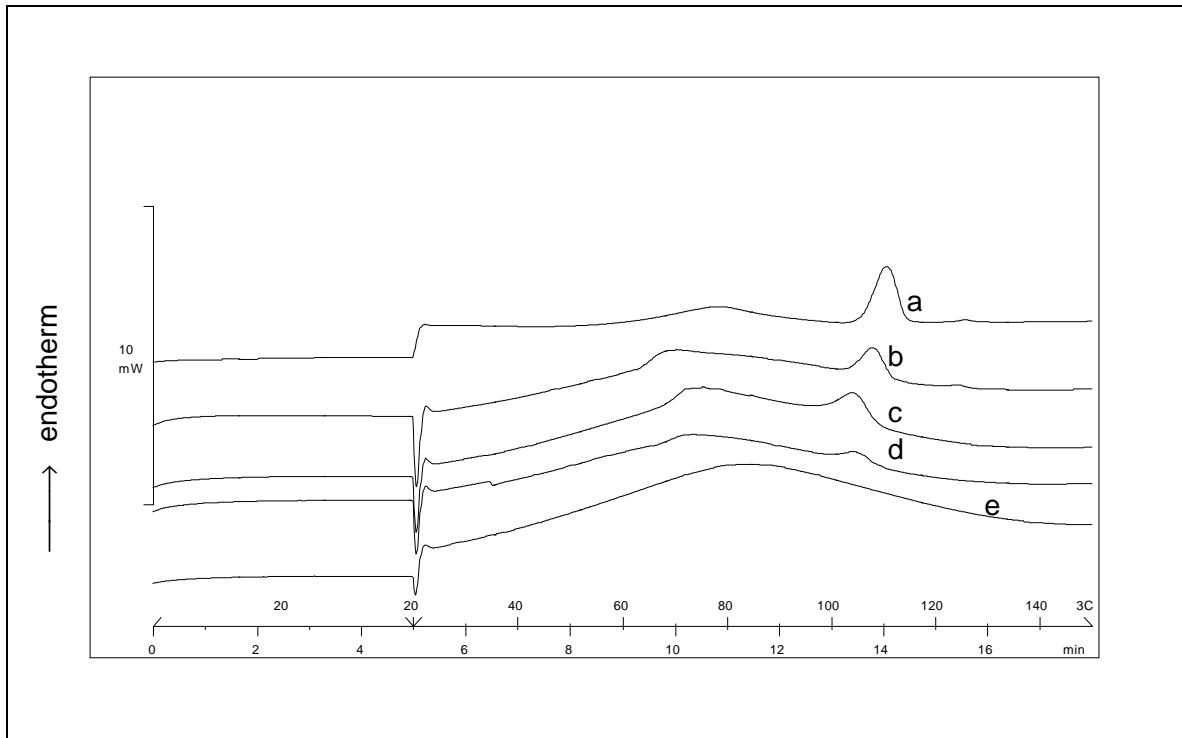


Abb. 26: DSC-Thermogramme von CA / CE-β-CD-Systemen, a) reines CA, b) physikalische Mischung, c) Knetprodukt (ungewaschen), d) Knetprodukt (gewaschen), e) CE-β-CD-Referenz

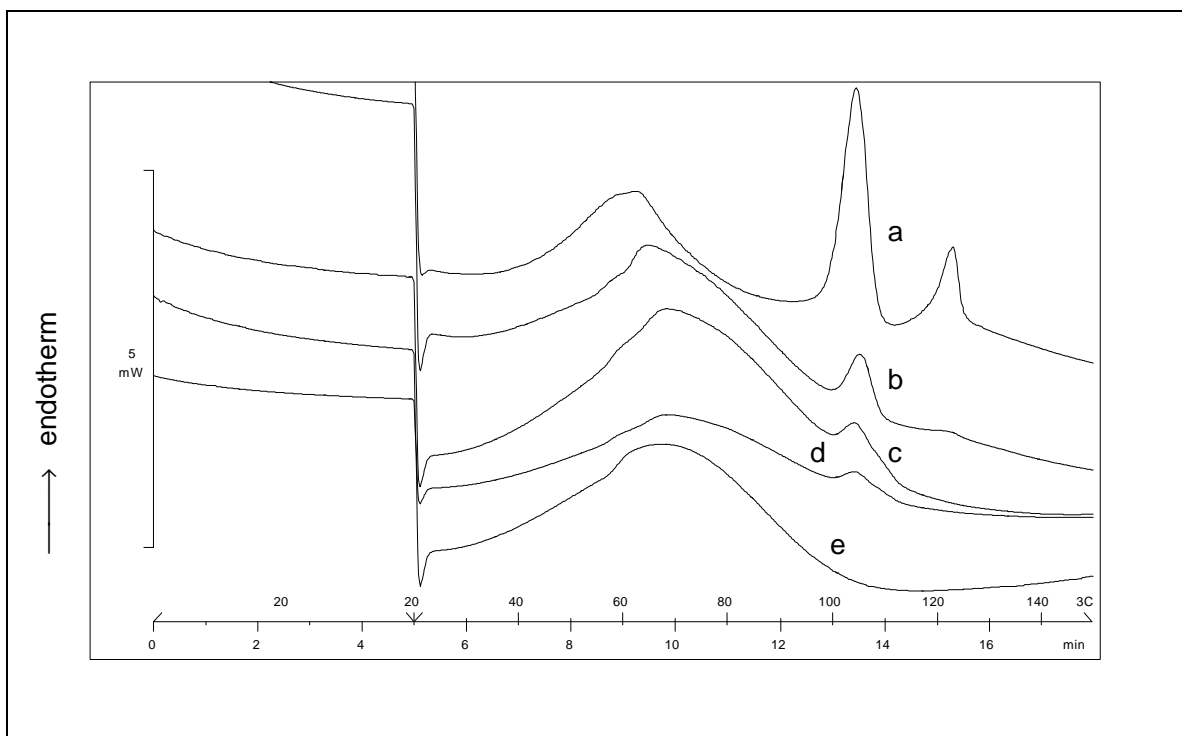


Abb. 27: DSC-Thermogramme von CA / HP- β -CD-Systemen, a) reines CA, b) physikalische Mischung, c) Knetprodukt (ungewaschen), d) Knetprodukt (gewaschen), e) HP- β -CD-Referenz

2.3.3.2.5 Thermomikroskopie

Die Thermomikroskopie dient zur visuellen Beobachtung der thermischen Veränderungen oder der Messung der Lichtdurchlässigkeit einer Probe auf einem Mikroskopheiztisch. Dabei wird sie einem Temperaturprogramm unterworfen. Diese Untersuchung erfolgte exemplarisch an der physikalischen Mischung und der Einschlußverbindung des CA mit β -CD. Abb. 28 und Abb. 29 lassen das Verhalten der physikalischen Mischung und der Einschlußverbindung des CA mit β -CD in einer Heizkammer bei 25°C, 90°C und 120°C vergleichen (Licht- und Thermomikroskopie, 4.3.12).

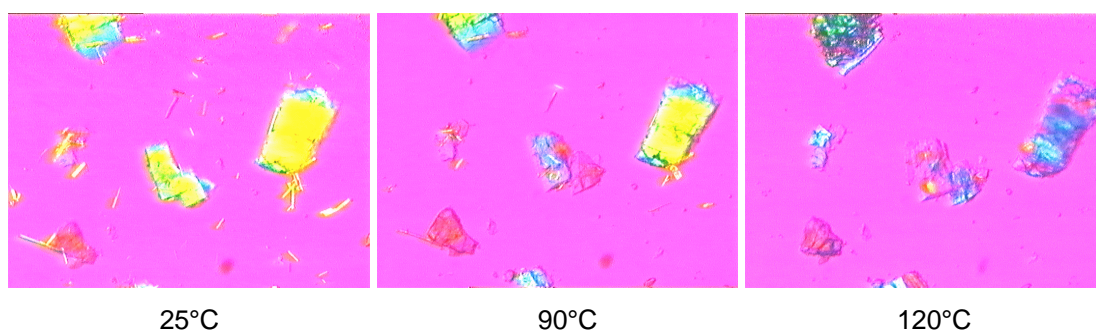


Abb. 28: Thermomikroskopische Aufnahmen der physikalischen Mischung aus CA und β -CD

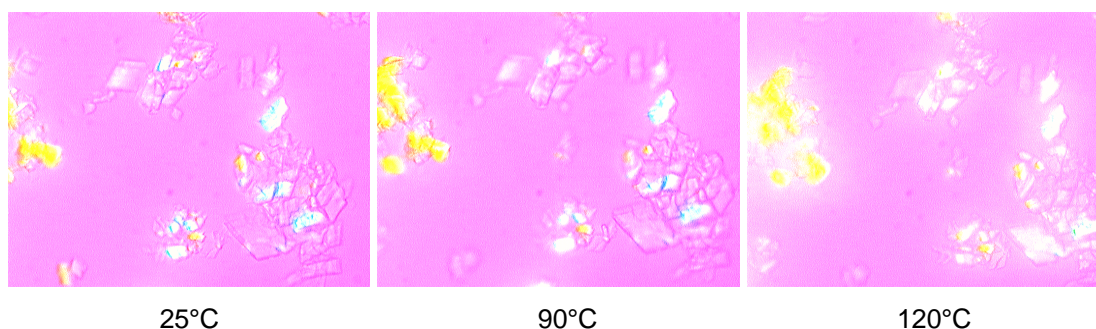


Abb. 29: Thermomikroskopische Aufnahmen des CA / β -CD-Koprazipitats

In Abb. 28 zeigen sich im zweiten Bild (90°C) erste thermische Effekte einiger Strukturen. Dieses beginnende Schmelzen bei ca. 90°C ist der CA-Reinsubstanz zuzuordnen, ihr Schmelzpunktpeak liegt bei ca. 105°C. Die Strukturen des β -CD werden bei Temperaturen bis 120°C nicht sichtbar beeinflusst. Im dritten Bild (120°C) sind nur noch kristalline Strukturen des β -CD zu erkennen. Der Arzneistoff ist vollständig geschmolzen.

Abb. 29 läßt im Temperaturbereich bis 120°C keine visuellen erfaßbaren thermischen Effekte an den betrachteten Fraktionen des CA / β -CD-Knetprodukts erkennen und deutet somit auf Einschluß des CA hin. Da auch über den Schmelzpunkt des CA hinaus kein partielles Schmelzen eintritt, ist hier ein deutlicher Unterschied zur physikalischen Mischung zu sehen. Die thermomikroskopischen Aufnahmen bestätigen insofern die DSC-Befunde, die im Kavitat keinen Schmelzpunktpeak des CA signalisieren. (vgl. Abb. 22).

2.3.3.2.6 ^1H -NMR-Spektroskopie

Die Ergebnisse der DSC-Untersuchungen von CA / β -CD und CA / Dimeb ergaben von allen sechs geprüften β -Cyclodextrinen die eindeutigsten Hinweise auf Bildung von echten Einschlüssen. Deshalb sollten im folgenden mittels ^1H -NMR-Spektroskopie die Kavitatbildung unterstützend bewiesen und gegebenenfalls Aufschluß über genaue stöchiometrische Verhältnisse erhalten werden.

β -Cyclodextrin (β -CD)

In D_2O konnte von der Verbindung kein brauchbares Spektrum erhalten werden. Das Protonenspektrum des Calcitriol-Analogon in Methanol - D_4 zeigte im Bereich von 3,0 bis 4,2 ppm keine Signale, die zur Verbindung gehörten. Die Signale der Methylgruppen, der Olefine und der funktionalisierten Protonen ließen sich gut erkennen und zuordnen.

Da das Kavitat auch nicht ausreichend wasserlöslich (D_2O) ist, wurden Lösungsversuche in folgenden Lösungsmitteln durchgeführt.

- Ethanol - D_6
- Methanol - D_4
- Ethanol - $\text{D}_6/\text{D}_2\text{O}$ in verschiedenen Mischungsverhältnissen

Es resultierte in allen Fällen nur eine sehr geringe Löslichkeit des Kavitats ($\ll 1 \text{ mg / ml}$). Die Ethanol / Wasser Gemische wurden nach Zugabe des Komplexes bis 40°C erwärmt, um eine bessere Löslichkeit zu erzielen. Dies gelang jedoch nur bedingt, so daß aufgrund der Trübung der Probe keine präzisen Langzeitmessungen vorgenommen werden konnten.

In allen Fällen zeigte sich im Protonenspektrum, daß das Calcitriol-Analogon zur Isomerisierung neigt und meist zwei äquimolare Komponenten vorlagen. Bereits die einfachen Protonenspektren konnten nur nach sehr langer Meßzeit mit Lösemittelunterdrückung mit geringem Signal/Rausch-Verhältnis erhalten werden. 2D-COSY, NOESY bzw. ROESY-Spektren lieferten daher keine auswertbaren Ergebnisse.

Da sich aber reines Calcitriol-Analogon sehr gut in Methanol -D₄ löst und ¹H-NMR-spektrometrisch untersuchen läßt, kann zumindest auf das tatsächliche Vorliegen eines Komplexes aufgrund von stark veränderten Lösungseigenschaften geschlossen werden. Strukturaussagen konnten wegen unzugänglicher Meßresultate nicht getroffen werden.

In einem aprotischen Lösungsmittel, wie DMSO, löst sich der Komplex sehr gut, doch konnte eine Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten nicht nachgewiesen werden. Offenbar dissoziiert der Komplex in diesem Lösemittel.

1,8-Dimethyl-β-Cyclodextrin

1,8-Dimethyl-β-Cyclodextrin zeigt im Protonenspektrum (in D₂O) sehr diffuse Signale zwischen 3,4 und 4,0 ppm sowie anomere Protonen bei etwa 5,2 ppm. Der Gemischcharakter des Spektrums läßt sich durch den durchschnittlichen Substitutionsgrad von 1,81 Methylgruppen pro Glucoseeinheit (laut Herstellerangaben) ableiten. Durch dieses diffuse Erscheinungsbild ist es schwer, die Protonen H-3' und H-5', die sich im Inneren des torusförmigen Cyclodextrinderivats befinden, zuzuordnen. Diese sind aber von entscheidender Bedeutung, um Wechselwirkungen des Cyclodextrins mit dem Gastmolekül in der Kavität nachzuweisen.

Vom Kavitat selbst wurden Protonenspektren, COSY- sowie NOESY-Spektren in D₂O bei Raumtemperatur und 500 MHz aufgenommen. Das Protonenspektrum zeigte vor allem für das Calcitriol-Analogon verbreiterte Linien. Wegen der heterogenen Signalform des Dimeb konnte keine genaue Stöchiometrie für den Komplex ermittelt werden.

Die breiten Linien haben zur Folge, daß das COSY-Spektrum nur Korrelationen für den Cyclodextrinteil zeigte, während alle anderen allenfalls zu erraten waren. Die erkennbaren Signale für das Calcitriol-Analogon ließen sich dadurch nur sehr schwer zuordnen.

Im NOESY-Spektrum (Nachweis räumlicher Nähen) konnten intensive Wechselwirkungen von Protonen der Methylgruppen der Seitenkette an C-17 und der Protonen H-18 des CA zu den Protonen des Cyclodextrins nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte auch H-1 des CA noch deutliche Wechselwirkungen mit den Cyclodextrin-Wasserstoffen. Die interessanten Signale H-19 und H-3 konnten durch Überlappung nicht eindeutig lokalisiert werden, doch scheinen auch diese mit den Cyclodextrinprotonen in Wechselwirkung zu stehen.

Sowohl der A-Ring als auch der D-Ring und die Seitenkette des Gastmoleküls sind dem Cyclodextrin räumlich recht nahe (< 5 Anström). Leider konnte zwischen den "inneren" Protonen H-3' und H-5' sowie den "äußeren" Protonen H-2', H-4' und H-6' des CD-Derivats nicht unterschieden werden, da das Dimeb nicht einheitlich vorlag (heterogene Substitution). Damit war die genaue Struktur des Komplexes mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nicht nachweisbar, jedoch konnte ein Einschluß aufgrund dieser Ergebnisse bestätigt werden.

2.3.4 Resümee

Eine besondere Eigenschaft der Cyclodextrine ist ihre Fähigkeit, Einschlußverbindungen mit geeigneten Gastmolekülen in festem Zustand und in Lösung zu bilden.

Die Komplexbildung in Lösung kann zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Löslichkeit des eingeschlossenen Gastmoleküls führen. Zur Ermittlung von Löslichkeitsisothermen des CA wurden mit vier der sechs untersuchten β -CD-Derivaten Phasenlöslichkeitsdiagramme aufgenommen. Die Fähigkeit des CA, einen Einschluß in Lösung zu bilden, wird durch die ermittelte Komplexstabilitätskonstante für das jeweilige System beschrieben.

Dimeb, G_2 - β -CD und β -CD-Polymer führen im gemessenen Bereich (Konzentration des Cyclodextrin-Derivats bis ca. 6 %) zu Isothermen vom A_L -Typ. Es resultiert lineare Erhöhung der Löslichkeit des CA in Wasser in Abhängigkeit von der CD-Konzentration ohne Ausfällung des Komplexes aus der wässrigen Cyclodextrin-Lösung. Für das System CA / Dimeb errechnet sich die höchste Komplexstabilitätskonstante. Die für die

Systeme G₂- β -CD und β -CD-Polymers ermittelten Konstanten liegen um den Faktor 2 bzw. 3,3 niedriger.

Das System CA / β -CD ist durch einen B_S-Kurventyp charakterisiert. Die Berechnung der Komplexstabilitätskonstanten wird im ansteigenden Ast der Kurve (Konzentration an Cyclodextrin bis ca. 0,6 %) vorgenommen. Sie ist um den Faktor 1,5 niedriger als die für das System CA / Dimeb errechnete.

Zur Charakterisierung der festen Assoziate wurden DSC-Untersuchungen durchgeführt. Zur Untersuchung gelangten lediglich mittels Kopräzipitation und Knetmethode hergestellte Produkte. Durch Lyophilisation hergestellte Assoziate des Systems CA / Dimeb waren aufgrund ihres amorphen Charakters nicht thermoanalytisch zu charakterisieren. Eine Unterdrückung des Schmelzpeaks wird in der DSC als Nachweis für die Existenz eines Kavitats angesehen. Dieses Phänomen ist bei den Systemen CA / β -CD und CA / Dimeb deutlich zu beobachten. Die Komplexbildung führt bereits bei den ungewaschenen Produkten zum vollständigen Verschwinden der Schmelzpeaks. Die Systeme des CA mit G₂- β -CD und β -CD-Polymer lassen dagegen den Schmelzpunktpeak des Arzneistoffs in den ungewaschenen Addukten erkennen. Durch Waschvorgänge konnte am Komplex adsorbierter Arzneistoff teilweise entfernt werden. Eine quantitative Entfernung anhaftender Gastkomponente konnte ohne Gefahr der Dissoziation der Komplexe nicht durchgeführt werden. Infolgedessen sind in den dargestellten Thermogrammen dieser Systeme noch Schmelzpunktpeaks des CA detektierbar. Die Thermoanalyse der Systeme des CA mit CE- β -CD und HP- β -CD erlaubten nicht, auf Komplexbildung zu schließen. Die eingesetzten Herstellverfahren führten zu Systemen, die sich thermoanalytisch ähnlich den physikalischen Mischungen verhielten.

Am Beispiel des CA / β -CD-Systems ließen sich exemplarisch das Verhalten der physikalischen Mischung und der Einschlußverbindung mittels Thermomikroskopie veranschaulichen und die DSC-Befunde unterstützen.

Die Systeme, CA / β -CD und CA / Dimeb, die als echte Kavitate anzusehen sind werden mittels ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht. Aufgrund der zu geringen Löslichkeit des CA / β -CD-Kavitats in D₂O waren jedoch keine auswertbaren Spektren zu erhalten. Im Falle von CA / Dimeb konnten räumliche Nähen mit Hilfe der Aufnahme von NOESY-Spektren gezeigt werden. Sowohl der A-Ring als auch der D-Ring und die Seitenkette des CA sind dem Cyclodextrin räumlich recht nahe. Allerdings war wegen unscharfer Spektren, die

auf den Gemischcharakter des Dimeb zurückzuführen sind, die Zuordnung der im Innern des CD-Torus lokalisierten Protonen unmöglich. Eine Wechselwirkung der Protonen des A-Rings als auch des D-Rings und der Seitenkette mit den „inneren“ Protonen des Dimeb-Torus ist wahrscheinlich.

2.4 β -Cyclodextrin-Kavitate in Dermatika

Die Auswahl des Vehikels für eine hochpotente Wirkstoffkomponente, wie das CA, ist für die Steuerung der Freisetzung und damit für die Wirksamkeit und Verträglichkeit von entscheidender Bedeutung. Für den zukünftigen Einsatz in der lokalen Therapie der Psoriasis wird eine Fettsalbe entwickelt. Weiterhin ist eine hydrophile Zubereitung in Form eines Hydrogels als Variante für die Applikation am Haaransatz vorgesehen.

Im Rahmen dieses Abschnittes wird der Einfluß von β -Cyclodextrinen auf das In-vitro-Liberationsverhalten des CA aus Fettsalben und Hydrogel untersucht. Anschließend werden ausgewählte Formulierungen am Tiermodell im Hinblick auf ihre Irritation, Effektivität und transdermale Resorption des CA geprüft.

2.4.1 Versuchsdurchführung

Zur Ermittlung der Einflüsse von β -Cyclodextrinen auf die In-vitro-Freisetzung des CA aus Fettsalben wurden Vehikel auf Basis von Kohlenwasserstoff (V) und Triglycerid-Kohlenwasserstoff (TK) zur Aufnahme der Wirkstoff-Systeme mit β -CD, Dimeb, G₂- β -CD und β -CD-Polymer hergestellt.

Zur Durchführung der In-vitro-Liberationsstudien dienten zunächst TK-Zubereitungen (Tabelle 9) mit CA / β -Cyclodextrin-Systemen entsprechend einer Wirkstoffkonzentration von 0,01 %. Mit fortschreitender Entwicklung der klinischen Prüfungen zur Dosisfindung wurde die Konzentration halbiert, so daß zum Zeitpunkt der Herstellung der V-Zubereitungen Konzentrationen von 0,005 %, berechnet auf den Wirkstoff, rezeptiert wurden. Eine dieser V-Zubereitungen wurde neben den In-vitro-Liberationsuntersuchungen auch in vivo an haarlosen Mäusen (In-vivo-Untersuchungen, 4.3.9) geprüft.

Weiterhin wurde die Liberation von CA aus einem Hydrogel auf Polyacrylatbasis unter Verwendung der β -Cyclodextrin-Derivate Dimeb und G₂- β -CD bestimmt. Diese Auswahl erfolgte im Hinblick auf die Absicht, CA in therapeutischen Konzentrationen in Hydrogelen zu „solubilisieren“. Dafür wurden CD-Konzentrationen von 1 bzw. 2 %

benötigt (Phasenlöslichkeitsdiagramme, 2.3.3.2.1). β -CD gelangte aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit des CA / β -CD-Kavits nicht in Untersuchungen mit Hydrogelen.

Die CA-Konzentration in den Hydrogelen mit CA / β -Cyclodextrin-Komplex betrug 0,005 %, sowohl bei den In-vitro-Liberationsuntersuchungen als auch bei den In-vivo-Untersuchungen mit haarlosen Mäusen.

Als In-vitro-Liberationsapparatur diente wiederum das Diffusionszellsystem nach Franz [41] in einer Konsole mit Rührvorrichtungen (Apparatur 2: Geräte, 4.2). Die thermostatierte Akzeptorphase wurde blasenfrei in das Zellkompartiment eingefüllt und mit Hilfe eines Rührmagneten durchmischt. Das zu prüfende Dermatikum wurde in die offene Donatorvorrichtung der Zelle gebracht, indem die Prüfsubstanz auf die zuvor getränkte Membran mittels Schablone appliziert wurde. Als Membran zur Trennung von Donator- und Akzeptorkompartiment gelangte die Cuprophan-Membran zum Einsatz. Die Probenentnahmen von jeweils 1 ml erfolgten über den Gesamtzeitraum von sechs Stunden nach 30, 60, 120, 180, 240, 300 und 360 Minuten. Das Akzeptorkompartiment wird nach jeder Probenentnahme mit der jeweils aliquoten Menge des Akzeptormediums aufgefüllt. Die quantitative Erfassung des liberierten Arzneistoffs erfolgte mittels RP-HPLC. Methanol und gereinigtes Wasser (pH \approx 6,5) dienten im Verhältnis 1:1 (V/V) als Imprägnier- bzw. Akzeptormedium. Im Akzeptor sind "sink Bedingungen" für den Wirkstoff gewährleistet. Bei dem pH Wert von 6,5 verhält sich das CA stabil. Für die In-vitro-Liberationsuntersuchungen aus Hydrogelen wurde die Cuprophan-Membran mit Silikonöl beschichtet (In-vitro-Liberation, 2.2.1), um die physikalische Trennung zwischen hydrophiler Donator- und Akzeptorphase zu gewährleisten sowie hydrodynamische Effekte zu vermindern.

2.4.2 Formulierungen

Die Entwicklung einer Grundlage für die Behandlung der psoriatisch veränderten Haut sollte den Anforderungen dieses Hautzustandes gerecht werden. Ferner werden hohe chemische und physikalische Stabilität, Kompatibilität mit dem Wirkstoff sowie In-vivo-Verträglichkeit der Grundlage vorausgesetzt.

Neben einer Fettsalbe ist die Entwicklung eines Hydrogels vorgesehen. Die Lösung eines hydrophoben Arzneistoffs wie CA, in einem Hydrogel in therapeutischer Dosierung ist ohne Zusatz von „Solubilisatoren“ nicht möglich. Der Zusatz von Alkoholen oder Emulgatoren muß bei psoriatisch erkrankter Haut aufgrund deren irritativer Potenz als kritisch eingeschätzt werden. Ein Zusatz von Cyclodextrinen könnte dagegen durch die verbesserte Löslichkeit des CA den Einsatz von Lösungsvermittlern überflüssig machen.

Die Herstellung der Placebo- und Verumformulierungen ist im Experimentellen Teil (Herstellung der halbfesten Zubereitungen, 4.3.6) beschrieben. Die lipophilen Zubereitungen wurden für die Freisetzungsuntersuchungen mindestens 24 h vor Versuchsbeginn hergestellt, um die direkte Nachhärtung nach der Herstellung abzuwarten. Homogenität der Grundlage und Verteilung der Wirkkomponenten (gelöst oder suspendiert) werden mikroskopisch kontrolliert.

Zur Sicherstellung des deklarierten Gehalts wurden Gehaltsbestimmungen von CA in den zu prüfenden Zubereitungen durchgeführt. Im Falle der Fettsalben mußte eine Extraktionsmethode entwickelt werden, die quantitativ den Wirkstoff von Fettbestandteilen separiert, um eine störungsfreie HPLC-Analytik zu gewährleisten (Gehaltsbestimmungen, 4.3.10).

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, daß das Verfahren zur Einarbeitung von Cyclodextrinen in Vehikel eine wichtige Rolle bezüglich der Freisetzungsbeeinflussung spielt [145]. Frühere Ergebnisse wurden mit vorgefertigten Cyclodextrin-Einschlüssen erhalten aber oft nicht mit dem Einsatz physikalischer Mischungen verglichen. Untersuchungen verdeutlichten, daß separat eingearbeitetes Cyclodextrin zu keiner Freisetzungsbeeinflussung führte [146].

In den vorliegenden Untersuchungen gelangen ausschließlich separat hergestellte β -Cyclodextrin-Assoziate in die wasserfreien Salben, da eine In-situ-Formation eines Kavitats normalerweise eine wässrige Phase voraussetzt. Daneben werden auch physikalische Mischungen zum Vergleich getestet.

Bei der Herstellung der Hydrogel-Systeme wird eine In-situ-Formation von CA / β -Cyclodextrin-Komplexen vorausgesetzt (Ergebnisse und Diskussion, 2.3.3).

Die in Tabelle 9 aufgeführten Testvehikel wurden in Anlehnung an aktuelle Entwicklungen im Rahmen des "CA-Projektes" der Schering AG Berlin ausgewählt.

Tabelle 9: Zusammensetzungen der Testvehikel

Triglycerid-Kohlenwasserstoff-Rezeptur (TK)	Kohlenwasserstoff-Rezeptur (V)																								
<table> <tr><td>Plastibase[®]</td><td>40,0 g</td></tr> <tr><td>Softisan[®] 378</td><td>50,0 g</td></tr> <tr><td>Glycerolmonostearat</td><td>5,0 g</td></tr> <tr><td>Miglyol[®] 812</td><td><u>5,0 g</u></td></tr> <tr><td>Gesamt</td><td>100,0 g</td></tr> </table>	Plastibase [®]	40,0 g	Softisan [®] 378	50,0 g	Glycerolmonostearat	5,0 g	Miglyol [®] 812	<u>5,0 g</u>	Gesamt	100,0 g	<table> <tr><td>Vaseline, weiß</td><td>75,0 g</td></tr> <tr><td>Paraffin, dickfl.</td><td>5,0 g</td></tr> <tr><td>Cetylstearylalkohol</td><td>5,0 g</td></tr> <tr><td>Softisan[®] 649</td><td>5,0 g</td></tr> <tr><td>Brij[®] 72</td><td>5,0 g</td></tr> <tr><td>Diisopropyladipat</td><td><u>5,0 g</u></td></tr> <tr><td>Gesamt</td><td>100,0 g</td></tr> </table>	Vaseline, weiß	75,0 g	Paraffin, dickfl.	5,0 g	Cetylstearylalkohol	5,0 g	Softisan [®] 649	5,0 g	Brij [®] 72	5,0 g	Diisopropyladipat	<u>5,0 g</u>	Gesamt	100,0 g
Plastibase [®]	40,0 g																								
Softisan [®] 378	50,0 g																								
Glycerolmonostearat	5,0 g																								
Miglyol [®] 812	<u>5,0 g</u>																								
Gesamt	100,0 g																								
Vaseline, weiß	75,0 g																								
Paraffin, dickfl.	5,0 g																								
Cetylstearylalkohol	5,0 g																								
Softisan [®] 649	5,0 g																								
Brij [®] 72	5,0 g																								
Diisopropyladipat	<u>5,0 g</u>																								
Gesamt	100,0 g																								
Hydrogel + Propylenglycol (HP)	Hydrogel + Liposomen (HL)																								
<table> <tr><td>Carbopol[®] 980 NF (vorneutr.)</td><td>0,5 g</td></tr> <tr><td>Propylenglycol</td><td>5,0 g</td></tr> <tr><td>Wasser</td><td><u>94,5 g</u></td></tr> <tr><td>Gesamt</td><td>100,0 g</td></tr> </table>	Carbopol [®] 980 NF (vorneutr.)	0,5 g	Propylenglycol	5,0 g	Wasser	<u>94,5 g</u>	Gesamt	100,0 g	<table> <tr><td>Carbopol[®] 980 NF(vorneutr.)</td><td>0,5 g</td></tr> <tr><td>Liposomen(Sojalecithin)</td><td>10,0 g</td></tr> <tr><td>Wasser</td><td><u>89,5 g</u></td></tr> <tr><td>Gesamt</td><td>100,0 g</td></tr> </table>	Carbopol [®] 980 NF(vorneutr.)	0,5 g	Liposomen(Sojalecithin)	10,0 g	Wasser	<u>89,5 g</u>	Gesamt	100,0 g								
Carbopol [®] 980 NF (vorneutr.)	0,5 g																								
Propylenglycol	5,0 g																								
Wasser	<u>94,5 g</u>																								
Gesamt	100,0 g																								
Carbopol [®] 980 NF(vorneutr.)	0,5 g																								
Liposomen(Sojalecithin)	10,0 g																								
Wasser	<u>89,5 g</u>																								
Gesamt	100,0 g																								
Hydrogel + Dimeb (HD)	Hydrogel + G ₂ -β-CD (HM)																								
<table> <tr><td>Carbopol[®] 980 NF (vorneutr.)</td><td>0,5 g</td></tr> <tr><td>Dimeb</td><td>1,0 g</td></tr> <tr><td>Wasser</td><td><u>98,5 g</u></td></tr> <tr><td>Gesamt</td><td>100,0 g</td></tr> </table>	Carbopol [®] 980 NF (vorneutr.)	0,5 g	Dimeb	1,0 g	Wasser	<u>98,5 g</u>	Gesamt	100,0 g	<table> <tr><td>Carbopol[®] 980 NF(vorneutr.)</td><td>0,5 g</td></tr> <tr><td>G₂-β-CD</td><td>1,2 g</td></tr> <tr><td>Wasser</td><td><u>98,3 g</u></td></tr> <tr><td>Gesamt</td><td>100,0 g</td></tr> </table>	Carbopol [®] 980 NF(vorneutr.)	0,5 g	G ₂ -β-CD	1,2 g	Wasser	<u>98,3 g</u>	Gesamt	100,0 g								
Carbopol [®] 980 NF (vorneutr.)	0,5 g																								
Dimeb	1,0 g																								
Wasser	<u>98,5 g</u>																								
Gesamt	100,0 g																								
Carbopol [®] 980 NF(vorneutr.)	0,5 g																								
G ₂ -β-CD	1,2 g																								
Wasser	<u>98,3 g</u>																								
Gesamt	100,0 g																								

2.4.3 In-vitro-Liberation

2.4.3.1 Salben auf Kohlenwasserstoffbasis

2.4.3.1.1 Dimeb

In Abb. 30 ist die Liberation verschiedener Dimeb-Assoziat aus der Formulierung auf Basis von Triglyceriden und Kohlenwasserstoffen (TK-Zubereitungen) dargestellt. Alle Zubereitungen wurden vor Versuchsbeginn auf ihren Gehalt an CA überprüft (Spezifikation: 95 - 105 % der Sollmenge).

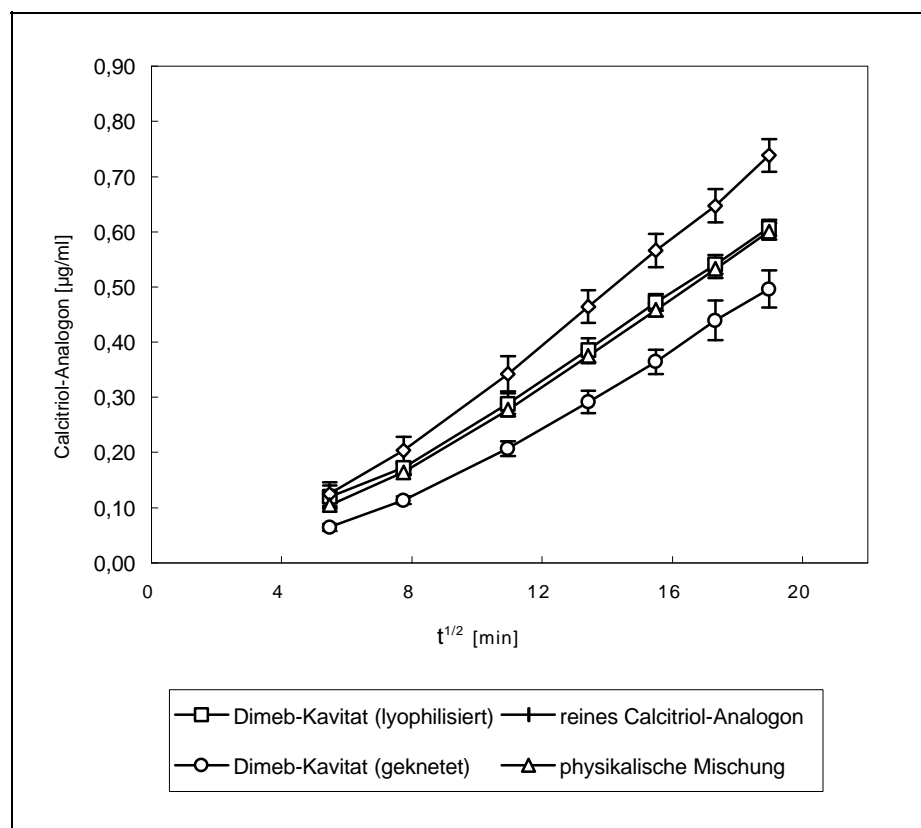


Abb. 30: Freisetzungsprofile von CA / Dimeb-Systemen aus einer Triglycerid-Kohlenwasserstoff-Grundlage in Methanol / Wasser bei 32°C (n=6, P=0,01)

Die Freisetzungsuntersuchungen werden über einen Zeitraum von 6 h durchgeführt, wobei die erste Messung nach 30 Minuten erfolgt, da die analytische Erfassung des CA erst zu diesem Zeitpunkt möglich ist (Bestimmungsgrenze). Alle drei Assoziat führen zu einer signifikanten Verminderung der Freisetzungsrates von CA. Aus der Zubereitung mit dem Knetprodukt wird schon initial weniger Arzneistoff liberiert. Nach 6 h befinden sich nur 72 % CA im Akzeptor, bezogen auf die Referenzformulierung mit reinem CA. Die

Assoziat in Form des Lyophilisats und der physikalischen Mischung zeigen ebenfalls eine Verminderung der CA-Freisetzung in den Akzeptor: Nach 6 h können 83 % bzw. 82 %, bezogen auf die liberierte Menge aus der Referenzformulierung, im Akzeptor nachgewiesen werden. Die aus dem linearen Bereich (matrixkontrollierte Phase) ermittelten Freisetzungsraten sind in Tabelle 10 enthalten.

Tabelle 10: Freisetzungsraten aus der Triglycerid-Kohlenwasserstoffgrundlage (TK)

Komponente im TK-Vehikel	Korrelationskoeffizient	Freisetzungsrates [µg/ml/min*10 ⁻³]
Reines CA	0,999	47,6 ± 0,3
Dimeb-Kavitat (geknetet)	0,999	34,5 ± 2,6
Dimeb-Kavitat (lyophilisiert)	0,999	38,9 ± 0,2
Physikalische Mischung	0,999	39,1 ± 0,8
β-CD	0,999	18,1 ± 0,4
G ₂ -β-CD	0,999	35,5 ± 0,9
β-CD-Polymer-Kavitat	0,999	36,7 ± 1,4

Initial verhalten sich die Formulierungen mit Lyophilisat und der physikalischen Mischung wie die Referenzzubereitung. Die Freisetzungsprofile von CA im Lyophilisat und in der physikalischen Mischung unterscheiden sich nicht signifikant (P=0,01). Es ist deshalb davon auszugehen, daß das Einschlußverfahren mittels Lyophilisation nicht erfolgreich ist bzw. ein partieller Einschluß von CA in Dimeb bei der Anfertigung der physikalischen Mischung (Verreibung) nicht ausgeschlossen werden kann. Für die Verreibung der physikalischen Mischung wurde gefriergetrocknete röntgenamorphe CA-Substanz eingesetzt, um beim Vergleich mit dem hergestellten Lyophilisationsprodukt Differenzen im Liberationsverhalten durch Modifikationsunterschiede auszuschließen. Es ist nicht auszuschließen, daß die geringfügig verminderten Freisetzungsraten gegenüber der Referenzzubereitung aus der veränderten Diffusionskinetik aufgrund der amorphen Struktur des Arzneistoffs resultieren.

Des weiteren ist von einer erhöhten Viskosität durch den erhöhten Feststoffanteil (Dimeb) auszugehen. Im allgemeinen sind die Diffusionskoeffizienten, die die

Beweglichkeit der Moleküle in einem System charakterisieren, umgekehrt proportional zur Viskosität [147].

Dies gilt allerdings nur dann, wenn die makroskopisch erfaßbare Viskosität repräsentativ für kleinste Volumenelemente des Systems ist.

Es ist wahrscheinlich, daß sich in gefriergetrockneten Produkten von CA und Dimeb keine Kavitate bilden, sondern ein physikalisches Gemisch auftritt. Diese Beobachtung wurde mit anderen Arzneistoffen ebenfalls gemacht [148,165].

Eine Erklärung liefert das Phasenlöslichkeitsdiagramm, welches sich als A_L -Typ abbildet (Phasenlöslichkeitsdiagramme, 2.3.3.2.1). Wenn am eutektischen Punkt, bei Sättigungskonzentrationen der Einzelkomponenten, das Löslichkeitsprodukt des Kavitats nicht überschritten wird, kann keine feste Einschlußverbindung während des Gefriertrocknungsprozesses präzipitieren.

2.4.3.1.2 Weitere Cyclodextrin-Derivate

In Abb. 31 ist die Liberationsbeeinflussung weiterer CA / Cyclodextrin-Assoziat aus der TK-Grundlage dargestellt.

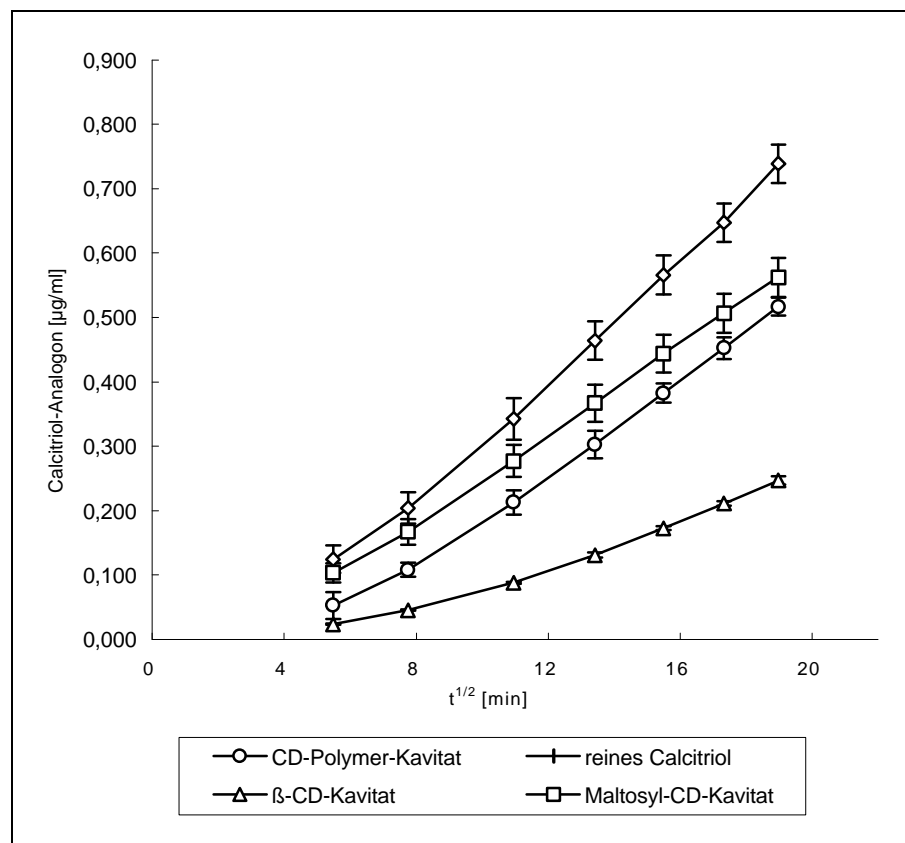


Abb. 31: Freisetzungsprofile von verschiedenen CA / β -Cyclodextrin-Systemen aus einer Triglycerid-Kohlenwasserstoff-Grundlage in Methanol / Wasser bei 32°C (n=6, P<0,01)

Die Liberation von CA wird durch die Anwesenheit der verwendeten β -Cyclodextrin-Derivaten aus der TK-Formulierung vermindert. Initial werden aus der β -CD- und der β -CD-Polymer-Zubereitung ähnlich geringe Mengen freigesetzt. Die Referenzzubereitung (reines CA) und die Formulierung mit G₂- β -CD zeigen vergleichsweise hohe Startwerte. Nach 6 h werden aus der G₂- β -CD-Zubereitung 75 %, aus der β -CD-Polymer-Formulierung 77 % und aus der β -CD- Formulierung lediglich 38 %, bezogen auf die aus der Referenzformulierung freigesetzte Menge, im Akzeptor bestimmt. Die ermittelten Freisetzungsraten (matrixkontrollierte Phase) sind in Tabelle 10 enthalten. Die Unterschiede der Freisetzungsraten von CA / β -CD-Derivaten aus der Triglycerid-Kohlenwasserstoff-Grundlage sind relativ gering. Eine Ausnahme bildet die CA / β -CD-Formulierung. Der Wirkstoff wird aus diesem System stark verzögert freigesetzt.

In Abb. 32 ist die Liberationsbeeinflussung durch CA / β -CD aus der V-Zubereitung dargestellt.

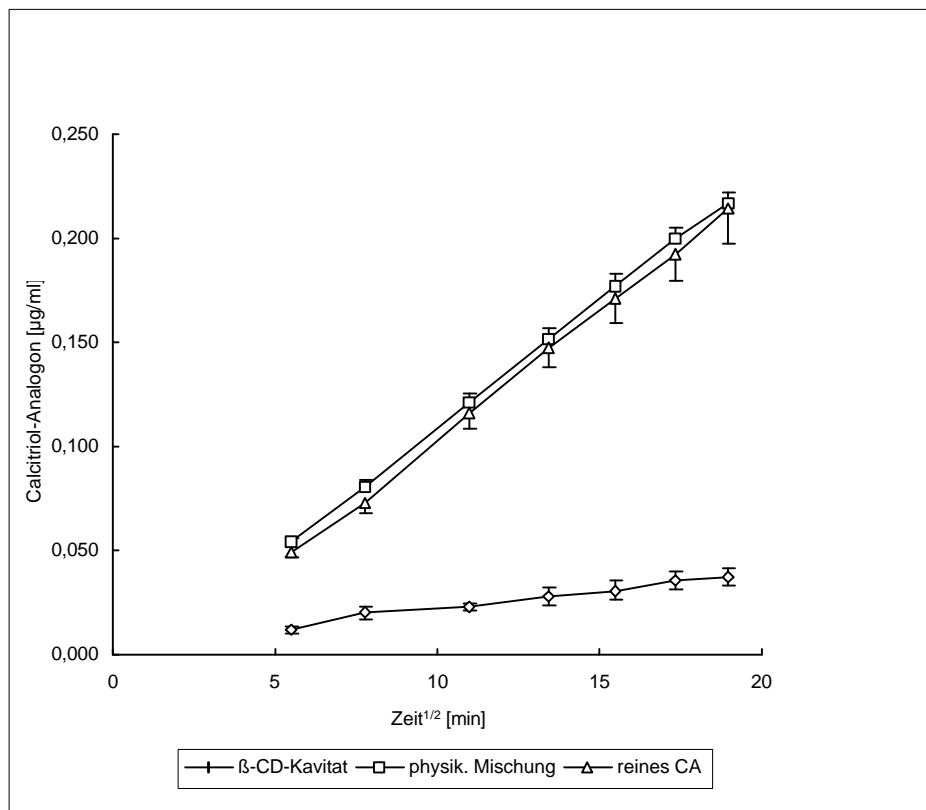


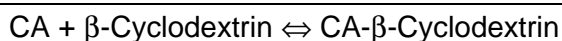
Abb. 32: Freisetzungsprofil eines CA / β -CD-Systems gegenüber reinem CA und einer physikalischen Mischung aus einer Kohlenwasserstoff-Grundlage (V) in Methanol / Wasser bei 32°C (n=6, P<0,01)

Die Liberation von CA ist durch den Einschluß mit β -CD aus der V-Formulierung ebenfalls erheblich verringert. Gegenüber der Referenzformulierung, die reines CA enthält, zeigt sich schon anfänglich eine verminderte Freisetzungsrates. Nach 6 h befinden sich lediglich 14 % der Menge an CA, bezogen auf die Referenzformulierung, im Akzeptor. Die physikalische Mischung zeigt keine deutliche Abweichung gegenüber der Referenzformulierung und entspricht damit dem bereits in Abb. 30 für die TK-Formulierung dargestellten Verhalten. Die aus dem linearen Bereich (matrixkontrollierte Phase) ermittelten Freisetzungsrates sind in Tabelle 11 enthalten.

Tabelle 11: Freisetzungsrates aus einer Kohlenwasserstoffgrundlage (V)

Komponente im V-Vehikel	Korrelationskoeffizient	Freisetzungsrates [$\mu\text{g/ml/min} \cdot 10^{-3}$]
Reines CA	0,999	$11,9 \pm 1,1$
β -CD-Kavität	0,998	$1,7 \pm 0,2$
Physikalische Mischung	0,999	$12,2 \pm 0,2$

Dem Effekt der Einflußnahme von β -Cyclodextrinen auf die Liberation von CA aus den wasserfreien Formulierungen liegen folgende Überlegungen zugrunde: In Anwesenheit des komplexierenden Agens (β -Cyclodextrin) im Vehikel kann folgendes Gleichgewicht angenommen werden:



Wenn die Konzentration des Arzneistoffs in den membranangrenzenden Diffusionsschichten aufgrund der Permeation in das Akzeptormedium abnimmt, dient der Komplex möglicherweise als Reservoir. Der Verlust unverkapselter Substanz aus der Donor-Phase wird durch Dissoziation des Komplexes kompensiert, um somit die "pseudo-steady-state"-Diffusion durch die Membran aufrecht zu erhalten.

CA ist in den Komponenten Miglyol® 812 und Diisopropyladipat in den eingesetzten Konzentrationen löslich. Die Anwesenheit der β -Cyclodextrine setzt die Konzentration an freiem bzw. gelöstem CA herab. Dies ist möglicherweise ein Grund für die leicht verminderte Freisetzung der korrespondierenden physikalischen Mischungen gegenüber dem Profil von reinem CA, insbesondere aus der TK-Formulierung.

Für die geringere Freisetzung infolge CA-Einschlusses könnte auch die Einflußnahme auf die thermodynamische Aktivität des Wirkstoffs verantwortlich sein. Ein Wirkstoff besitzt im gelösten Zustand seine größte thermodynamische Aktivität [149]. Die Löslichkeit einer Substanz wird durch Einschluß in ein Cyclodextrin maßgeblich beeinflusst, da ein Komplex mit neuen physikalischen Eigenschaften entsteht. Liegen reines CA und Komplex nebeneinander vor, wird nicht gebundenes CA leichter in der Vehikelmatrix und durch die Membran diffundieren, da Diffusion direkt abhängig ist von der Molekülgröße. Zusätzlich ist die Diffusion des CA abhängig von den Komplexstabilitätskonstanten. Je stärker ein Cyclodextrin in Wechselwirkung mit Strukturen der Grundlage tritt und je höher seine Konstante mit dem CA ist, desto geringer wird die Diffusion von CA durch die Vehikelmatrix in den Akzeptor sein. Ein Nachweis von diffundierendem CD konnte nicht vorgenommen werden, da die freigesetzten Konzentrationen an CD im Akzeptor unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Das Ausmaß an freiem CA in den Kavität-enthaltenden Zubereitungen hängt nicht nur von den Komplexstabilitätskonstanten, sondern auch von Konkurrenzreaktionen der β -Cyclodextrine mit Bestandteilen der Salbengrundlage ab. Ausgehend von den berechneten Komplexstabilitätskonstanten in wässriger Lösung (Tabelle 7) müßten die Freisetzungsraten von CA aus den Dimeb-, G₂- und Polymer- β -CD-Systemem stärker differieren. Offensichtlich lassen sich die Affinitäten des Gastmoleküls zu den β -Cyclodextrinen in wässrigen Systemen nicht unmittelbar auf lipophile halbfeste Systeme übertragen. Diese Beobachtung wurde auch von Orienti et al. [150] mit Ketoprofen gemacht. Die in verschiedenen Vehikeln ermittelten Stabilitätskonstanten sind signifikant erniedrigt gegenüber den in Wasser ermittelten. Dieses Verhalten könnte durch die unterschiedliche Affinität des Arzneistoffs zum hydrophoben Ring des β -Cyclodextrins einerseits und dem Vehikel, in dem der Arzneistoff gelöst oder dispergiert ist, andererseits erklärt werden. Es ist davon auszugehen, daß eine größere Löslichkeit eines Arzneistoffs im Vehikel mit einer geringeren Affinität zur hydrophoben Kavität eines β -Cyclodextrins korreliert.

Aufgrund der Herabsetzung von Komplexstabilitätskonstanten in halbfesten Zubereitungen und möglicher Konkurrenzreaktionen können in wässrigen Systemen gemessene Unterschiede der Wechselwirkungen zwischen Gastmolekül und Cyclodextrinen in halbfesten Zubereitungen nivelliert sein.

Die Stöchiometrie der in die Salbengrundlagen eingearbeiteten Komplexe spielt zusätzlich eine wichtige Rolle für die Liberation von CA. Ein Überschuß an β -Cyclodextrinderivat im Komplex, begründet durch periphere Wechselwirkungen der β -Cyclodextrine mit CA oder mangelnde Reindarstellung, kann das Gleichgewicht zugunsten einer verstärkten „Komplexformation“ mit Vehikelkomponenten verschieben. Dieser Einfluß wird sich in Abhängigkeit von der Größe der Komplexstabilitätskonstanten bemerkbar machen [56]. Werden die molaren Verhältnisse der verwendeten Komplexe verglichen, so weist das CA / β -CD-System das größte molare Verhältnis auf. In Verbindung mit einer relativ großen Komplexstabilitätskonstante ist die erhebliche Verminderung der Liberation von CA erklärbar. Die vergleichsweise niedrigeren Komplexstabilitätskonstanten der CA / Polymer- β -CD- und G₂- β -CD-Systeme sowie die kleineren molaren Verhältnisse führen zu höheren Freisetzungsraten gegenüber dem CA / β -CD-System.

Trotz der größeren Komplexstabilitätskonstante, ist die Freisetzungsrate von CA aus dem CA / Dimeb- System im Vehikel doppelt so hoch gegenüber dem CA / β -CD-System (Tabelle 10). Es ist anzunehmen, daß Dimeb besondere Affinitäten zu Salbenbestandteilen besitzt und deshalb das Gleichgewicht der Komplexbildung zwischen CA und Dimeb verschoben wird.

Für diese Hypothese sprechen auch Literaturbefunde. Es wird darüber berichtet, daß β -Cyclodextrine in der Lage sind, mit Hartfett [151], Fettsäuren [152], Mono-, Di- und Triglyceriden [153] Einschlußverbindungen zu bilden. Der Einschluß von Cetylstearyalkohol in β -Cyclodextrin wurde nachgewiesen [154]. Aus Literatur geht hervor, daß Dimeb eine besonders hohe Potenz zur Komplexbildung mit lipophilen Molekülen aufweist [43,76].

2.4.3.2 Hydrogele auf Polyacrylatbasis

In Abb. 33 ist die Liberation der Systeme CA / Dimeb und CA / G₂- β -CD gegenüber reinem CA aus Hydrogelen dargestellt.

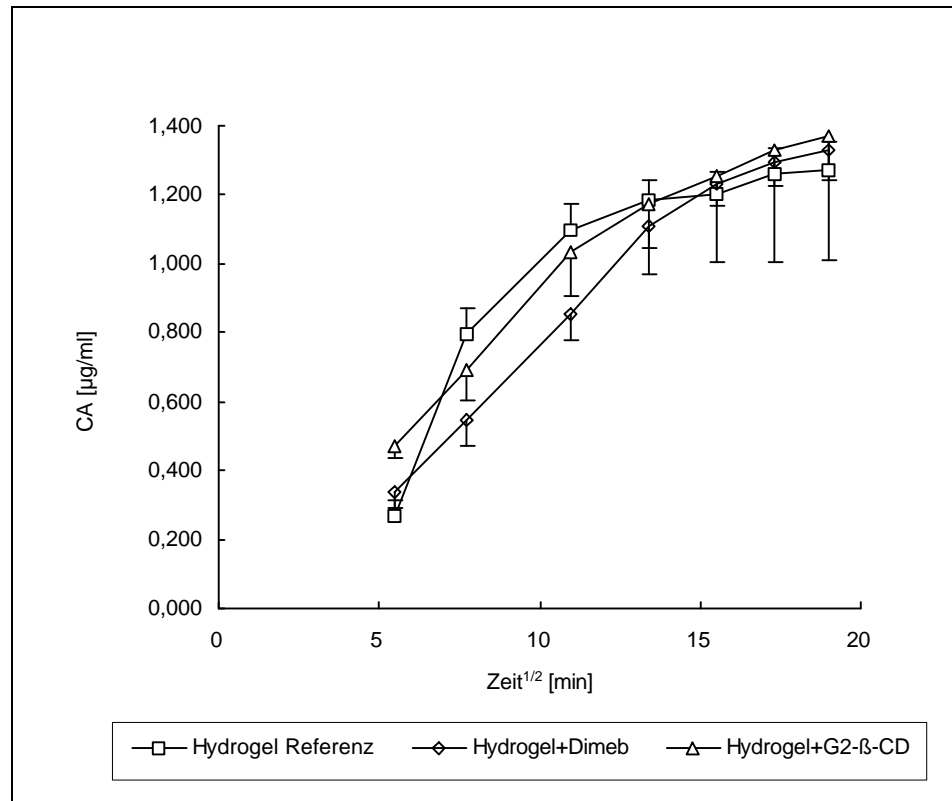


Abb. 33: Freisetzungsprofile der Systeme CA / Dimeb und CA / G₂-β-CD gegenüber reinem CA aus Hydrogelen in Methanol / Wasser bei 32°C (n=6, P<0,01)

Die In-vitro-Liberation von CA aus der Hydrogel-Formulierung mit Propylenglycol (HP) zeigt sehr hohe Startwerte, die aus dem "burst-effect" resultieren. Die Liberation verläuft demnach nicht membrankontrolliert. Die Lösungsgeschwindigkeit vom CA in der silikonisierten Cuprophane-Membran, vermittelt durch Propylenglycol, ist höher als die Diffusionsgeschwindigkeit im Hydrogel. Dadurch reichert sich der Arzneistoff sehr schnell in der Membran an und gelangt schnell in den Akzeptor.

Die Profile der Systeme mit Dimeb und G₂-β-CD demonstrieren lineare Freisetzungseigenschaften bis 3 h. Der Diffusionswiderstand der Membran(-imprägnierung) ist im Vergleich zu dem Diffusionswiderstand im Hydrogel sehr viel höher. Nach 3 h sind ca. 90 % CA in der Akzeptorphase nachzuweisen.

In den Hydrogelen mit β-Cyclodextrin-Zusatz liegt CA vollständig „solubilisiert“ vor. Nach der Herstellung werden transparente Gele erhalten. Die Mengen an Dimeb bzw. G₂-β-CD zur Löslichmachung von CA können aus den Phasenlöslichkeitsdiagrammen (2.3.3.2.1) abgeleitet werden. Es werden 1,0 % Dimeb und 1,2 % G₂-β-CD benötigt, um 0,005 % CA in Wasser zu lösen (Herstellung wässriger Lösungen des Calcitriol-Analogon (CA))

mit Cyclodextrinen, 4.3.1). Das Hydrogel ohne CD mit 5 % PG-Zusatz ist dagegen milchig trüb. Die Menge von 5 % PG im Hydrogel ist nicht ausreichend, um sämtliches CA in Lösung zu bringen.

Durch β -Cyclodextrine eingeschlossenes und damit gelöstes CA steht der Diffusion durch eine Zweischichtenmembran (Cuprophane mit Silikonöl beschichtet) nicht oder nur bedingt zur Verfügung [51]. Da die Komplexstabilitätskonstante von CA / Dimeb im Vergleich zu CA / G_2 - β -CD relativ groß ist, liegt im Hydrogel mit Dimeb das gelöste CA in einem höheren Ausmaß komplexgebunden vor als im Hydrogel mit G_2 - β -CD. Damit ist der Anteil an freiem und gelöstem CA, das durch die Membran diffundieren kann, im Hydrogel mit CA / Dimeb kleiner als im Hydrogel mit CA / G_2 - β -CD. Es resultiert eine geringere Diffusionsrate.

2.4.3.3 Hydrogele mit Liposomen

Im Rahmen der Fragestellung einer Retardierung der perkutanen Resorption von CA sind CA / Liposomen-Systeme in die In-vivo-Untersuchungen einbezogen worden. Diese sollen in der vorliegenden Arbeit als Ergänzung betrachtet werden, da sie nicht in direktem Zusammenhang mit der molekularen CD-Verkapselung stehen. Liposomale Formulierungen können effektive Freisetzungssysteme für die Behandlung von Hautkrankheiten darstellen. Insofern wächst das Interesse an Liposomen für die externe Therapie, um effektive lokale Wirkung mit geringen systemischen Effekten zu verbinden [155].

Für die Entwicklung eines Hydrogels mit der Indikation Psoriasis wäre eine Liposomen-Hydrogel-Zubereitung durchaus interessant. Ein wesentlicher Vorteil könnte hierbei die Verarbeitbarkeit von CA ohne Alkohol sowie eine hohe Stabilität des Arzneistoffs in einer wässrigen Grundlage sein.

Werden Liposomendispersionen in Grundlagen eingearbeitet, so muß gewährleistet sein, daß die Vesikeln intakt bleiben und ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht durch das Vehikel verändert werden. Cremes benötigen als Zweiphasensysteme Emulgatoren, die zur unerwünschten Fusion der Vesikeln führen können. Detergentien werden in Liposomendispersionen in den Bilayer inkorporiert und verursachen Verän-

derungen in seinen physikalischen Eigenschaften [156]. In Untersuchungen zur topischen Applikation und klinischen Testung von Liposomen werden hauptsächlich wässrige Liposomendispersionen [157] oder Hydrogele [158] eingesetzt. Am geeignetsten erscheint eine Hydrogelgrundlage, die gleichzeitig die Viskosität des Systems erhöht, zur Immobilisierung der Vesikeln führt und damit zur Stabilisierung der Liposomendispersion beiträgt. Um konzentrationsbedingte Wechselwirkungen im System möglichst gering zu halten, wurde in Form von Polyacrylsäure ein Gelbildner ausgewählt, der schon bei niedrigen Konzentrationen Gele hoher Viskosität ausbildet.

Zur Herstellung des liposomenhaltigen Hydrogels wurde vorneutralisierte Polyacrylsäure in die Liposomendispersion eingerührt, um ein Ausflocken der Dispersion (keine Gelbildung) bei Zugabe von Polyacrylsäure (pH=3) zu vermeiden (Herstellung von Liposomen, 4.3.2). Aufgrund einer mittleren Vesikelgröße von < 100 nm und der Konzentration an Liposomen von 10 % ist von der Bildung unilamellarer Liposomen auszugehen. Eine Einlagerung des lipophilen Secosteroids CA in den Bilayer ist anzunehmen [159]. Mit den Liposomenzubereitungen wurden keine In-vitro-Untersuchungen durchgeführt.

2.4.4 In-vivo-Studien am Tiermodell

Im Verlauf der Wirkstofffindung (CA) hat die Experimentelle Dermatologie, Schering AG Berlin, ein Tiermodell (In-vivo-Untersuchungen, 4.3.9) als Screeningtest zur Ermittlung der lokalen und systemischen Wirksamkeit nach topischer Vitamin-D-Applikation entwickelt.

In diesem Modell wurden die V-Formulierung mit dem CA / β -CD-Kavität, die Hydrogele mit den Systemen CA / Dimeb und CA / G₂- β -CD und eine Liposomenpräparation geprüft. Die V-Formulierung mit dem CA / β -CD-Kavität wurde ausgewählt, weil diese Präparation die stärkste Retardierung in den In-vitro-Liberationsstudien gezeigt hatte. Die Hydrogele gelangten in die Untersuchungen, um vor allem das Verhältnis zwischen Effektivität und Verträglichkeit gegenüber der Referenzformulierung mit Propylenglykol zu testen.

Die dünne Haut haarloser Mäuse reagiert sensibel und schnell auf äußere Einflüsse. Beispielsweise wird durch Kontakt mit einem Irritant [160,161] eine epidermale Hyperproliferation und Hyperplasie ausgelöst. Diese Eigenschaften der Maushaut ermöglichen es, die Verträglichkeit von flüssigen und halbfesten Grundlagen nach topischer Applikation bereits nach kurzen Behandlungszeiten zu erfassen.

Nach topischer Applikation auf normaler Maushaut lösen Vitamin-D-Analoga, im Gegensatz zum antiproliferativen Effekt in Human- und Maus-Keratinozytenkulturen und in der Psoriasis, eine epidermale Proliferations- und Differenzierungsinduktion aus. Diese Wirkung resultiert in einer dosis- und zeitabhängigen Zunahme der Epidermisdicke und einer verstärkten Hautschuppenbildung. Die Epidermisdickenzunahme kann histologisch gut beobachtet werden. Darüber hinaus wird ein dosis- und zeitabhängiges Erythem induziert, jedoch wird dieser Parameter durch die Epidermishyperplasie und Schuppenbildung überdeckt und ist schlecht quantifizierbar.

Vitamin-D-Analoga, die nur schwach an den Vitamin-D-Rezeptor binden, zeigen in diesem Modell nur eine geringere Reaktion. Daher werden die nach lokaler Applikation vom CA beobachteten Effekte als rezeptormediiert und Vitamin-D-spezifisch angesehen. Systemisch verfügbare und aktive Vitamin-D-Analoga mobilisieren dosis- und zeitabhängig Calcium aus Darm und Knochen (Hypercalcämie). Ein Anstieg des Serumcalciumspiegels nach topischer Applikation läßt daher prinzipiell indirekte Rückschlüsse auf die Freisetzung des Wirkstoffs aus der Grundlage und dessen Penetration durch die Haut zu.

2.4.4.1 Ergebnisse

Die Wirkungen der Grundlagen sowie die Verumwirkungen auf die Epidermishyperplasie sind in Abb. 34 dargestellt. Im Vergleich mit unbehandelter Maushaut haben die Placebo-Hydrogel-Grundlagen keinen signifikanten Einfluß auf die Epidermisdicke, mit Ausnahme des Liposomenplacebos, der eine leichte Wirkung zeigt. Alle anderen getesteten Zubereitungen führten zu einer Epidermishyperplasie, inklusive der Placebo-Salbenformulierungen. Die eingesetzten Salben auf Kohlenwasserstoffbasis besitzen okklusiven Charakter. Die beobachtete Hyperplasie der Epidermis in der Maushaut ist vermutlich auf die Salbenhilfsstoffe (z.B. Emulgatoren) zurückzuführen, deren Wirkung durch die Okklusion verstärkt werden kann.

Psorcutan® (Wirkstoff: Calcipotriol) diente als Referenzformulierung in diesem Modell zur Einstufung der Wirkstärke der neuen Formulierungen. Der neue Wirkstoff CA in identischer Salbenformulierung erwies sich in diesem Modell als etwas wirksamer als Psorcutan. Ähnlich wirksam wie Psorcutan verhielt sich das Polyacrylatgel mit 5 % Propylenglycol.

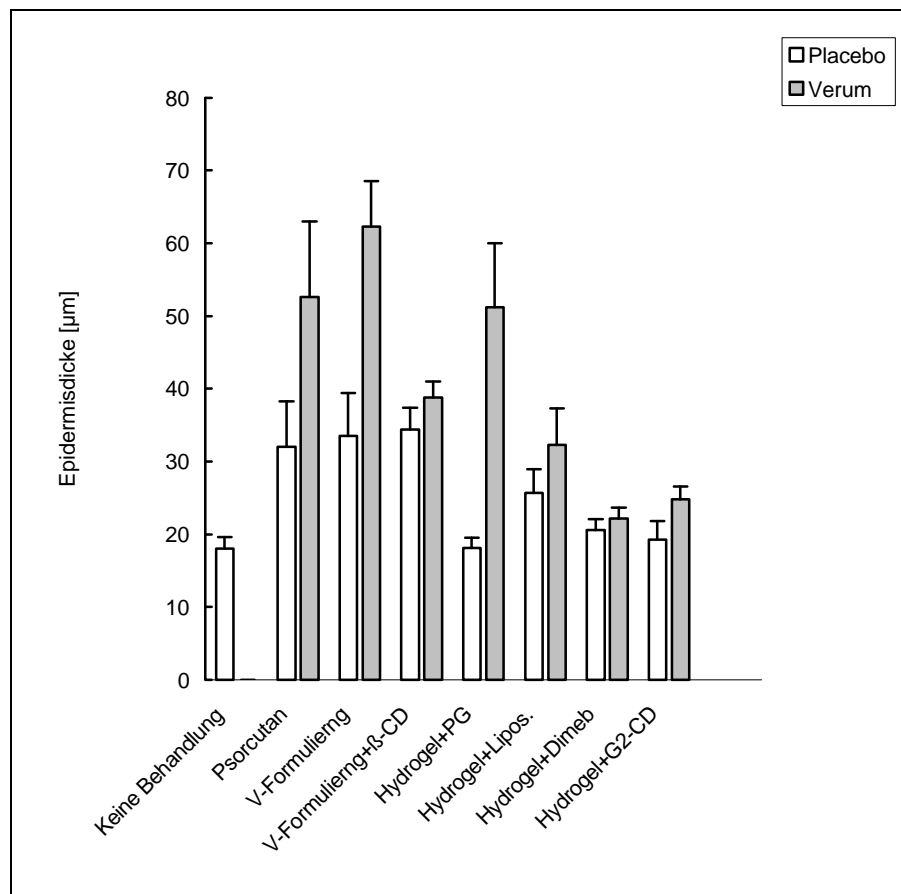


Abb. 34: Epidermis-Hyperplasie

Der Einschluß des CA in das β -CD führte im Falle der Salbenformulierung zu einem deutlich verminderten Effekt in bezug auf die Epidermishyperplasie. Die Zunahme der Epidermisdicke ist nicht signifikant gegenüber dem Placebo ausgeprägt. Das Hydrogel mit CA / Dimeb-System zeigt ebenso keine ausgeprägte Wirkung auf die Epidermisdicke. Das CA / G_2 - β -CD-Hydrogel und die Inkorporierung des Wirkstoffs in Liposomen bzw. in Liposomenmembranen führten zu einem signifikanten, aber verminderten Effekt auf die Epidermis gegenüber den Referenzformulierungen ohne β -Cyclodextrin. In Abb. 35 ist die um die Grundlagen korrigierte Verumwirkung graphisch dargestellt.

Systemisch verfügbare Vitamin-D-Derivate können substanzspezifisch eine Hypercalcämie induzieren. Die systemische Wirkstoffbelastung wird mit Hilfe des Serumcalciumspiegels und des Körpergewichts abgeschätzt.

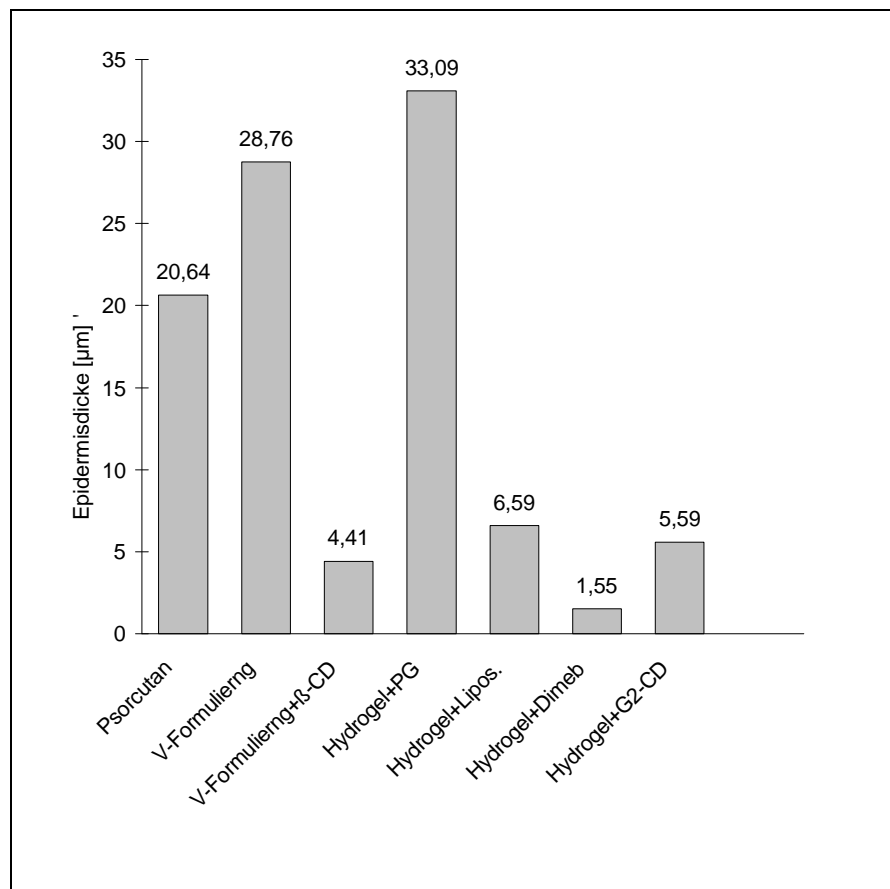


Abb. 35: Epidermis-Hyperplasie, Verum- abzüglich Placebowirkung

In Abb. 36 sind die Placebo-Grundlagen sowie die Verumwirkung (CA-haltig) auf die Serumcalciumkonzentration dargestellt. Im Vergleich mit unbehandelter Maushaut haben die Grundlagen bis auf die V-Zubereitung keinen signifikanten Einfluß auf die Serumcalciumkonzentration ($p=0,05$). Die Verumwirkung aller Formulierungen ist gegenüber den Placebos dagegen statistisch signifikant ausgeprägt ($p=0,05$).

Tendenziell am stärksten ist dieser Effekt nach Applikation von Psorcutan und der V-Formulierung zu beobachten.

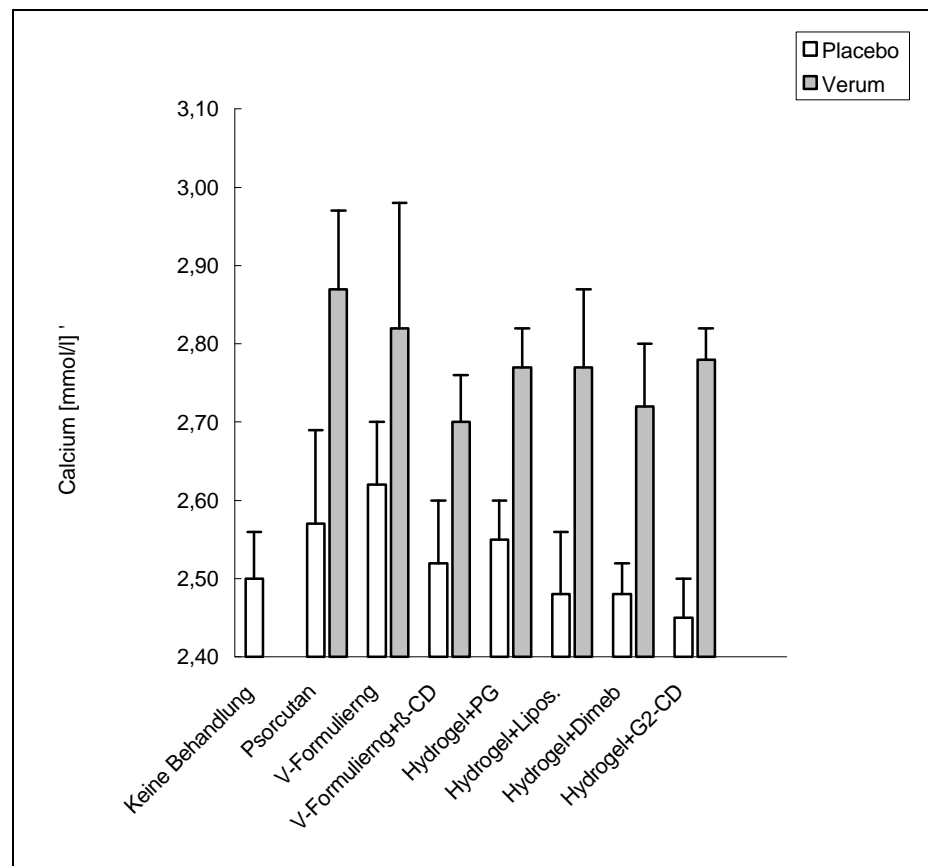


Abb. 36: Serumcalciumkonzentration

Zur Veranschaulichung sind in Abb. 37 die Grundlagenwirkungen erneut von den Verumwirkungen subtrahiert worden. Nach Abzug der Placebowirkung zeigt das Hydrogel in Anwesenheit von 1,2 % G₂-β-CD die stärkste Wirkung auf die Serumcalciumkonzentration. Etwas schwächere Effekte sind bei der Referenz Psorcutan sowie dem Hydrogel mit Liposomen zu beobachten. Die anderen Zubereitungen zeigen geringere Werte in vergleichbarer Größenordnung.

Interessanterweise zeigt sich, daß die gemessenen Serumcalciumkonzentrationen im Falle der β-Cyclodextrin-Systeme nicht mit den Effekten der Epidermishyperplasie korrelieren. Diese Tatsache führt zu folgenden Annahmen: Da die Mäuse während der topischen Behandlung keine Halskrause trugen, ist eine orale Aufnahme nicht auszuschließen. Dies würde einen Anstieg der Serumcalciumkonzentration durch alle Formulierungen erklären. Die gefundenen Erhöhungen des Serumcalciumspiegels können daher lediglich einen orientierenden Hinweis bezüglich Freisetzung des Wirkstoffs aus der Grundlage und dessen Permeation durch die Haut liefern.

In weiteren getesteten Formulierungen² wurde allerdings die Beobachtung gemacht, daß eine schwache Hautwirkung bezüglich der gemessenen Parameter nicht mit einer Hypercalcämie im Zusammenhang steht. Dies könnte darauf hindeuten, daß die Freisetzung und Penetration des Wirkstoffs aus diesen Vehikeln geringer ist. Darüber hinaus spricht diese Beobachtung dafür, daß wahrscheinlich das oral aufgenommene CA für die Auslösung einer Hypercalcämie quantitativ keine Bedeutung besitzt. In diesem Fall ist anzunehmen, daß die Zubereitungen mit Cyclodextrin-Systemen und Liposomen geringere Epidermishyperplasie verursachen, aber trotzdem eine Permeation von CA durch die Maushaut stattfindet (Vergleich der In-vitro- / In-vivo-Daten, 2.4.4.2).

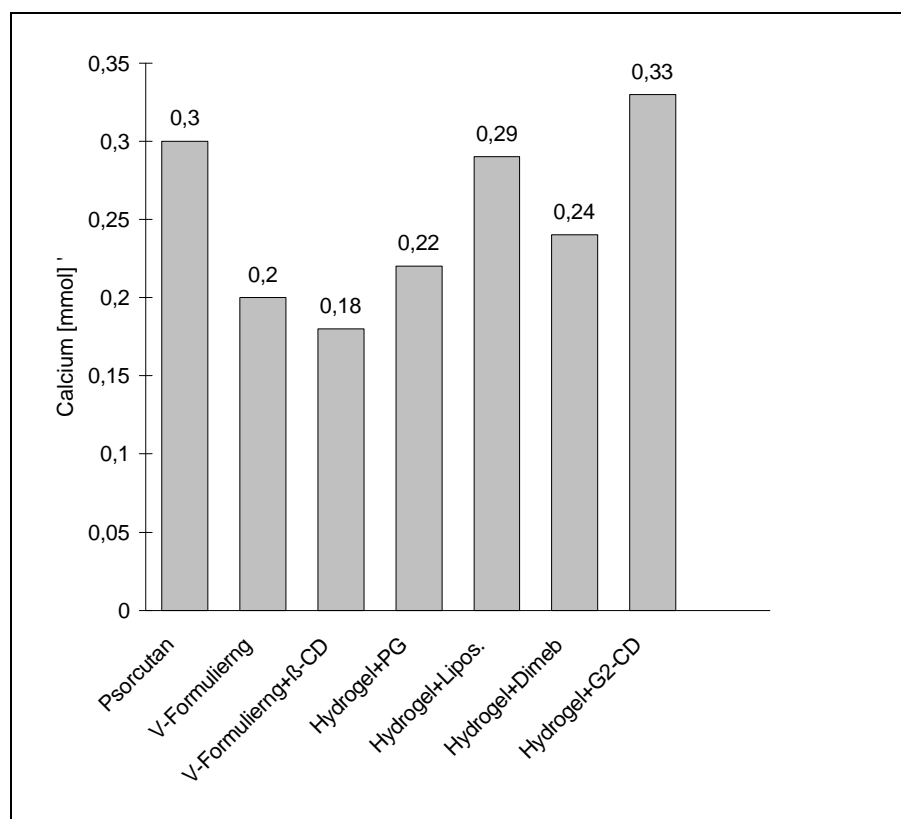


Abb. 37: Serumcalciumkonzentration, Verum- minus Placebowirkung

2.4.4.2 Vergleich der In-vitro- / In-vivo-Daten

Untersuchungen zur perkutanen Resorption werden aus unterschiedlichen Zielsetzungen heraus unternommen und liefern je nach Anforderung und Betrachtungsweise des Durchführenden bestimmte Ausschnitte des gesamten Resorptionsprozesses. Eine

² nicht veröffentlicht

Methode, die alle Abschnitte des Prozesses der perkutanen Resorption, von der Liberation bis hin zu pharmakodynamischen Effekten nach Penetration oder Permeation, modelliert, kann es nicht geben (Dermale Applikation von Arzneistoffen, 1.1).

Da in In-vitro-Modellen nur Teilaspekte der Arzneistoffverfügbarkeit geprüft werden können, ist eine In-vitro / In-vivo-Korrelation nur in definierten Fällen zulässig.

Bei Messungen der Liberation aus Dermatika sind die Voraussetzungen für ein aussagekräftiges Experiment hinreichend definiert, wenn der Akzeptor sink-Bedingungen zulässt und die gewählte Membran keinen geschwindigkeitslimitierenden Faktor darstellt. Die Geschwindigkeit der Liberation wird dann durch die Diffusion des Arzneistoffs im Vehikel und/oder auch durch die Auflösung suspendierten Arzneistoffs bestimmt. In diesem Fall ist die liberierte Menge der Wurzel der Zeit proportional. Dieser Parameter repräsentiert als gemessene „maximale Liberation der Zubereitung“ eine Größe, die auf Zustand und Eigenschaften der Formulierung schließen lässt (In-vitro-Liberation, 2.2.1). Inwieweit diese Größe in vivo relevant ist, hängt vom Applikationsort und dem Zustand der Haut ab. Je geringer der Diffusionswiderstand an der applizierten Stelle ist, desto stärker beeinflusst die Liberation aus dem Vehikel den Resorptionsprozeß in und durch die Haut. Hautstellen mit fehlender oder krankhaft veränderter Hornschicht (z.B. bei Psoriasis) oder nicht verhornte Schleimhäute büßen ihre Barriereeigenschaften ein. In diesen Fällen kann die In-vivo-Resorptionsgeschwindigkeit des Arzneistoffs der In-vitro-Liberationsgeschwindigkeit nahe kommen.

Zur Abschätzung von Konzentrationsprofilen in der Haut und des transdermalen Flusses (systemische Verfügbarkeit) werden In-vitro-Untersuchungen mit exzidierte Haut durchgeführt. Die Haut von Menschen und Säugetieren hat zwar eine grundsätzlich ähnliche Struktur, allerdings unterscheiden sich ihre Permeabilitäten beträchtlich [162].

Die Haut haarloser Mäuse wird in der Erforschung transdermaler Resorption aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit Humanhaut weit verbreitet eingesetzt. Das Stratum corneum von haarlosen Mäusen ist jedoch weniger als halb so dick, verglichen mit Humanhaut. Dies zeigt sich auch in einer mehr als zweifachen Reduktion der Barriereeigenschaften [163].

In Abschnitt 2.2.5 werden die Freisetzungsprofile von Advantan-Zubereitungen aus In-vitro-Liberationsuntersuchungen mit den Ergebnissen an haarloser Mauhaut in ihrer Rangordnung verglichen. Die vorgestellte Liberationsmethode besitzt Vorteile gegenüber

In-vitro-screening-Untersuchungen mit haarloser Maushaut. Für Aussagen über pharmakodynamische Effekte in der Haut und im System müssen allerdings In-vivo-Untersuchungen durchgeführt werden.

Die In-vitro-Liberationsstudien mit CA / β -Cyclodextrin-Systemen aus Fettsalben demonstrieren eine Reduktion der Freisetzung von CA nach erfolgreicher Assoziatbildung mit den eingesetzten β -CD-Derivaten. Die stärkste Retardierung kann durch Einschluß mit β -CD erreicht werden.

Im Nacktmausmodell zeigt die V-Formulierung mit β -CD eine deutlich verminderte Effektivität in Hinblick auf die Epidermishyperplasie (Abb. 32). Es liegt nahe, die verminderte Liberation von CA aus dem Vehikel für dieses Phänomen verantwortlich zu machen. Betrachtet man die Ergebnisse der In-vitro-Freisetzen aus den Hydrogel-Formulierungen, sind die Unterschiede zur Referenzformulierung mit Propylenglycol vor allem in der Freisetzungsscharakteristik zu suchen (Hydrogele auf Polyacrylatbasis, 2.4.3.2). Nach 3 h liberieren alle drei Hydrogele 90 % CA in den Akzeptor. Die Freisetzungsraten entsprechen in ihrer Rangordnung dem Einfluß auf die Epidermisdicke haarloser Mäuse, allerdings sind die Wirkungen der β -CD-Systeme maßgeblich vermindert gegenüber der Referenz Psorcutan®. Es ist nicht anzunehmen, daß die gemessenen Unterschiede in der Freisetzung in vitro für die eklatanten Unterschiede in vivo verantwortlich sind. Unter diesen Gesichtspunkten muß der Einfluß der β -Cyclodextrine auf pharmakodynamische Zusammenhänge angenommen werden.

Diese These wird auch durch die Tatsache gestützt, daß bei allen Formulierungen erhöhte Serumcalciumkonzentrationen nach erfolgter Behandlung gemessen wurden. Damit wurde gezeigt, daß CA das Blutkompartiment erreichte und eine Wirkung entfalten konnte. Die Wirkung von CA am Vitamin D-Rezeptor in der Haut haarloser Mäuse könnte demnach durch die Anwesenheit der CD verringert oder sogar verhindert sein. Diese Vorgänge setzen eine Diffusion intakter Komplexe in die Epidermis voraus. Über die Vorgänge der Verteilung und Diffusion von Komplexen im Vergleich zu den Einzelkomponenten, Wirts- und Gastmolekül, sind keine experimentellen Daten erhoben worden. Eine Differenzierung der beschriebenen Diffusionsvorgänge von reinem CA bzw. CA im β -CD-System im Vehikel und zwischen Haut und Vehikel konnte daher nur auf theoretischer Basis erfolgen.

2.4.5 Stabilitätsuntersuchungen

Als konjugiertes Trien unterliegt das CA verschiedenen Isomerisierungsreaktionen, wobei die Isomerisierung zum Prävitamin des CA die größte Bedeutung hat. Während das CA in Kristallform nicht isomerisiert, liegt in Lösung ein Gleichgewicht zwischen dem CA und dem Prävitamin vor. Die Strukturformel des Prävitamins ist Abb. 38 zu entnehmen. Die IUPAC-Bezeichnung des Prävitamins lautet Isopropyl (6Z,22E)-(1S,3R,24R)-1,3,24-trihydroxy-9,10-secocholesta-5(10),6,8,22-tetraene-25-carboxylat.

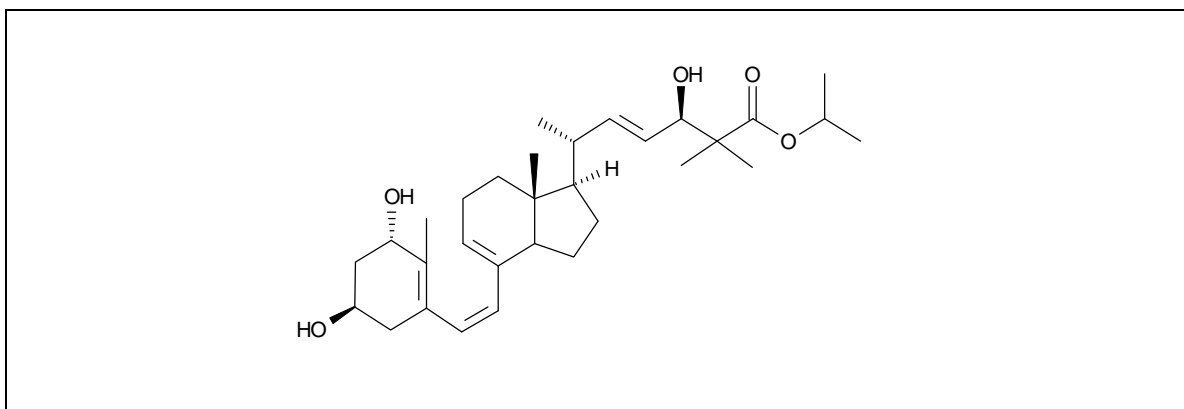


Abb. 38: Prävitamin des CA

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Stabilitätsuntersuchungen an zwei ausgewählten Formulierungen auf Basis der TK-Rezeptur durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.4.2). Da die TK-Rezeptur als Ölkörper Miglyol 812 enthält, in dem sich das CA zu einem gewissen Anteil löst, sind im Laufe der Zeit verschiedene Abbau- und Isomerisierungsreaktionen des Moleküls zu erwarten. Der Einschluß des CA in ein Kavität könnte diese Abbau- und Isomerisierungsreaktionen teilweise verhindern. Um dies zu prüfen, wurden eine CA / Dimeb-haltige und eine CD-freie TK-Zubereitung in Konzentrationen von 0,01 %, jeweils bezogen auf den Wirkstoff, hergestellt und über einen Zeitraum von sechs Monaten bei 25°C und 40°C eingelagert. Zu definierten Zeitpunkten wurde der Gehalt an CA mittels HPLC überprüft (Stabilitätsuntersuchungen, 4.3.10). Die so ermittelten Gehaltswerte sind graphisch in Abb. 39 dargestellt.

Bei den bei 25°C gelagerten Proben ist eine leichte Abnahme des Gehaltes an CA über den Gesamtzeitraum von sechs Monaten zu verzeichnen. Die bei 40°C gelagerten Proben verhalten sich in den ersten drei Monaten ähnlich den bei 25°C gelagerten Proben, zeigen jedoch nach sechs Monaten eine deutliche Abnahme des Gehaltes an CA, die bis zu 40 % beträgt. Die zwei Lagerbedingungen lassen leichte Unterschiede

zwischen den beiden Formulierungen erkennen: Der Gehalt an CA in der Kavitat-Formulierung liegt jeweils etwas höher (ca. 5 %) als in der Formulierung mit reinem CA. Offensichtlich bewirkt der Einschluß des CA-Moleküls in das Dimeb eine leichte Stabilitäts-erhöhung des CA in diesem System.

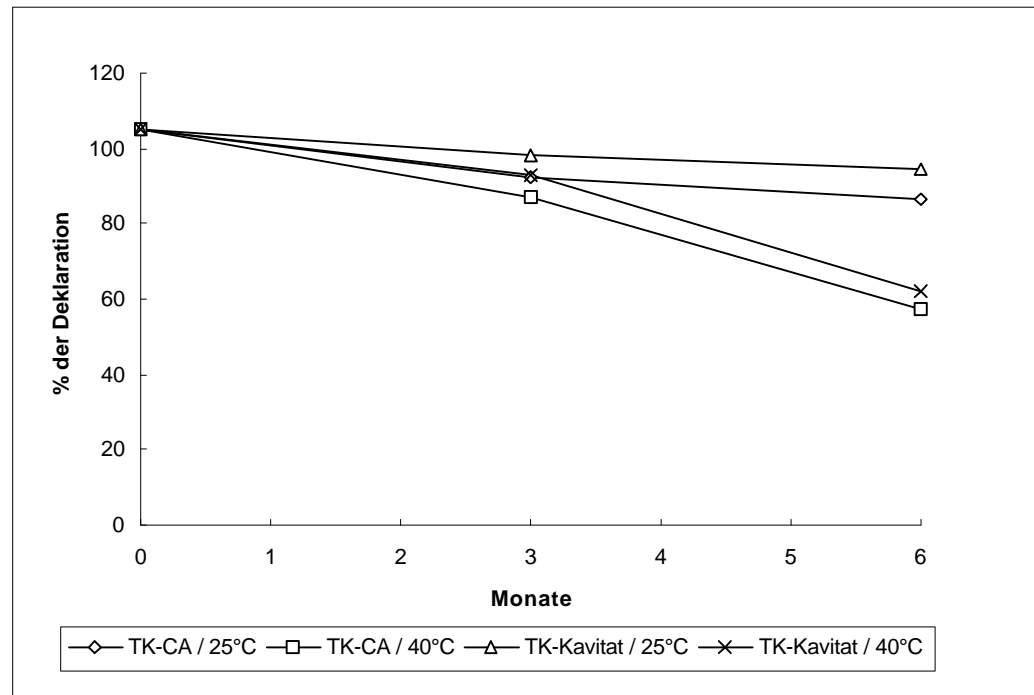


Abb. 39: Stabilität von CA in TK-Formulierungen bei 25°C und 40°C

3 Zusammenfassung

Vitamin D-Analoga haben in den letzten Jahren zunehmend an Interesse bei der topischen Behandlung der Psoriasis gewonnen. Allerdings ist die Behandlung aufgrund der hohen Potenz dieser Wirkstoffgruppe und ihrer damit verbundenen Nebenwirkungen restriktiv.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeit der Ausbildung von Einschlußverbindungen eines neuen Vitamin D-Analogons (Calcitriol-Analogon, Schering AG) in β -Cyclodextrin-Moleküle zu prüfen und die anfallenden Addukte hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Eigenschaften zu charakterisieren. Hierbei sollte besonders die Frage geklärt werden, ob mittels molekularer Mikroverkapselung retardierte Freigabe des Calcitriol-Analogons zu erreichen ist, um möglicherweise ein günstigeres Verhältnis zwischen Haupt- und Nebenwirkungen zu erzielen.

Die Arbeit gliedert sich in folgende Hauptabschnitte:

1. Etablierung einer In-vitro-Liberationsmethode für niedrig dosierte Dermatika allgemein
2. Herstellung und Charakterisierung von Vitamin D₃-Analogon / β -Cyclodextrin-Kavitaten
3. Liberationsstudien des Vitamin D₃-Analogons unter Einfluß von β -Cyclodextrinen aus verschiedenen halbfesten Einphasensystemen in vitro und in vivo

Eine Literaturrecherche über beschriebene Liberationsmodelle für cutane Systeme führte zu der Entscheidung, das statische Franz-Diffusionszellsystem für die geplanten In-vitro-Liberationsstudien auszuwählen. Zur Ermittlung der optimalen Parameter für die erforderlichen In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen wurde die Advantan-Fettsalbe (Schering AG), die als Arzneistoff das Corticosteroid Methylprednisolonaceponat (MPA) enthält, als Modell genutzt. Vier synthetische Membranen auf Basis von Celluloseacetat, Polyester, Polycarbonat sowie regenerierter Cellulose, imprägniert mit verschiedenen Agenzien, wurden unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Akzeptormedien getestet. Eine Cuprophan-Membran, imprägniert mit dem Akzeptormedium Methanol / Phosphatpuffer [1:1 (V/V); pH 5,0], erwies sich aufgrund des geringsten

Einflusses auf die Freisetzungskinetik als besonders geeignet und wurde für weitere Untersuchungen herangezogen.

Mit der für geringe Wirkstofffreisetzungsraten optimierten Methode wurde weiterhin die Freisetzung von MPA aus Advantan[®]-Salbe und -Creme vergleichend bestimmt und den Ergebnissen der MPA-Permeation durch haarlose intakte und gestrippte Maushaut gegenübergestellt. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der In-vitro-Daten ließ die Methode auch geringe Unterschiede im Freisetzungsverhalten von MPA sichtbar werden. Die erzielten Freisetzungsraten für Advantan[®]-Fettsalbe, -Salbe und -Creme bzw. -Lösung entsprechen in ihrer Rangordnung dem in In-vitro-Screening an haarloser intakter Maushaut ermittelten Ergebnissen (Creme > Salbe > Fettsalbe).

Die Studien mit den synthetischen Membranen zeigten jedoch Vorteile gegenüber den In-vitro-Untersuchungen mit haarloser Maushaut, da letztere ein zu hohes Streuungsmaß ergaben. Die erprobte In-vitro-Liberationsmethode ist geeignet zur Beurteilung der Liberationsbeeinflussung durch die Vehikelzusammensetzung und leistet damit Unterstützung bei der Vehikelauswahl im Rahmen der Formulierungsentwicklung und bei der Verfahrensentwicklung. Liberationsprofile sind ein wichtiger Parameter in Bezug auf die Reproduzierbarkeit des Herstellverfahrens beim "scaling-up" von Pilot-Chargen bis zur Endfertigung. Die vorgestellte Methode wird als Werkzeug zur Aufnahme von „control-charts“ bei der Verfahrensentwicklung in Zukunft eine wichtige Rolle spielen.

Eine besondere Eigenschaft der Cyclodextrine ist ihre Fähigkeit, Einschlußverbindungen mit Gastmolekülen in festem Zustand und in Lösung zu bilden. Die Berechnung molekularer Interaktionsfelder mit dem Software-Programm GRID ergaben Hinweise auf Bereiche hoher Affinität zwischen dem Calcitriol-Analogen und dem nativen β -CD. Vorstellbar sind einerseits Einschlüsse der Partialstruktur des A-Ringes des CA-Moleküls in den Hohlraum eines β -CD-Moleküls. Andererseits ist ein Einschluß der Esterseitenkette des Secosteroids ebenso plausibel. Diesen Betrachtungen zufolge ist die Bildung eines 2:1-Komplexes anzunehmen. Diese Untersuchungen dienen beispielhaft als theoretische Voruntersuchung zur Bestimmung der räumlichen Kompatibilität eines β -Cyclodextrin-Kavits.

Für die Herstellung der Calcitriol-Analogen-Assoziate mit den ausgewählten β -Cyclodextrinen β -Cyclodextrin (β -CD), 1,8-Dimethyl- β -cyclodextrin (Dimeb), β -Cyclodextrin-Polymer (β -CD-Polymer), Maltosyl- β -cyclodextrin (G_2 - β -CD), Hydroxypropyl- β -cyclo-

dextrin (HP- β -CD), Carboxyethyl- β -cyclodextrin (CE- β -CD) wurden verschiedene Methoden herangezogen. Die Herstellung der festen Kavitate erfolgte in Abhängigkeit vom Cyclodextrin-Typ mittels Knetmethode oder Kopräzipitation. Die Lyophilisation wurde erprobt, führte aber nicht zur Bildung von festen Kavitäten wie aus nachfolgenden Liberationsstudien geschlußfolgert wurde.

Die Assoziatbildung mit β -Cyclodextrin, Dimeb, β -Cyclodextrin-Polymer und G₂- β -CD in Lösung führte zu einer Verbesserung der Löslichkeit des Calcitriol-Analogons. Zur Ermittlung von Löslichkeitsisothermen wurden von vier der sechs Systeme Phasenlöslichkeitsdiagramme aufgenommen. Komplexstabilitätskonstanten wurden berechnet und wiesen das System CA / Dimeb als stabilsten Komplex aus.

Zur Charakterisierung der festen Assoziate mit sechs β -CD-Typen, hergestellt durch Kopräzipitation bzw. Knetmethode, dienten DSC-Untersuchungen. Lyophilisate des Systems Calcitriol-Analogon / Dimeb konnten aufgrund ihres amorphen Charakters nicht thermoanalytisch charakterisiert werden.

In-vitro-Freisetzungsstudien des Calcitriol-Analogons unter Einfluß von β -Cyclodextrinen erfolgten nach Inkorporierung in die für die Psoriasisbehandlung ausgewählten Fettsalben und Hydrogele. Infolge der sehr geringen Calcitriol-Analogon-Dosierung von 0,005-0,01 % wurde ein größer dimensioniertes Franz-Diffusionszellsystem als für die MPA-Freisetzung genutzt, so daß aufgrund des günstigeren Verhältnisses Membranfläche / Akzeptorvolumen höhere Konzentrationen des Arzneistoffs im Akzeptor zu vermessen waren. Damit konnte in Verbindung mit einer verbesserten Probenapplikationstechnik die Empfindlichkeit der Methode gesteigert werden.

Begleitend zu den Liberationsstudien sind Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt worden, um den deklarierten Gehalt der zu prüfenden Formulierungen zu gewährleisten. Dafür wurde eine Extraktionsmethode zur Isolierung von CA für die quantitative Analyse etabliert. Weiterhin wurde die Möglichkeit einer Stabilisierung des Arzneistoffs mittels Dimeb in einer Triglycerid-Kohlenwasserstoff-Grundlage geprüft. Der Einschluß des CA-Moleküls in Dimeb bewirkte eine leichte Stabilitätserhöhung des CA 6 Monate bei 25 und 40°C.

Nach physikalisch-chemischer Charakterisierung der Kavitate wurden die Systeme CA / β -CD, CA / Dimeb und CA / G₂- β -CD ausgewählt und in In-vivo-Studien am Tier geprüft. Für diese Systeme errechneten sich die höchsten Komplexstabilitätskonstanten.

Im Rahmen der Fragestellung einer Retardierung und einer besseren Verträglichkeit in Hinblick auf Hautirritation und systemische Nebenwirkungen des Calcitriol-Analogons bei der topischen Applikation wurden auch Systeme mit Liposomen hergestellt und in vivo geprüft.

Ausgewählte Formulierungen wurden im Nacktmausmodell im Hinblick auf ihre Irritationsstärke, Effektivität und transdermale Resorption des Calcitriol-Analogons getestet. Der Einschluß des CA in die β -Cyclodextrine führte zu einem deutlich verminderten Effekt in bezug auf dessen Epidermishyperplasie. Dieses zeigte sich sowohl nach Applikation der Salbenformulierung als auch des Hydrogels. Allerdings waren erhöhte Plasmacalciumspiegel in allen Fällen vorhanden. In diesem Modell konnte damit keine Reduktion der systemischen Verfügbarkeit des CA erreicht werden.

Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zum Erkenntnisstand der Bildung verschiedener CA / β -CD-Einschlüsse und ihrer Verarbeitbarkeit in topischen Einphasensystemen dar. Mit Hilfe einer optimierten In-vitro-Liberationsmethode konnten Aussagen zur Beeinflussung der Freisetzungsscharakteristik von CA durch β -CD-Einschlüsse getroffen werden. Im Ergebnis bewirkten die Calcitriol-Analogon / β -Cyclodextrin-Assoziate verminderte Freisetzung des Calcitriol-Analogons aus Fettsalben. Anhand von In-vivo-Studien am Tiermodell konnten die in vitro erzielten Ergebnisse bestätigt werden. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen bleibt zu klären, inwieweit die beobachteten Befunde an der Maus auf den Menschen übertragbar sind.

4 Experimenteller Teil

4.1 Substanzen

Substanzen	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Riedel-de Haen, Hannover
Advantan [®] -Creme	Schering AG, Berlin
Advantan [®] -Fettsalbe	Schering AG, Berlin
Advantan [®] -Lösung	Schering AG, Berlin
Advantan [®] -Salbe	Schering AG, Berlin
Bienenwachs	Astor-Stag SA, Eupen, Belgien
Calcitriol-Analogon	Schering AG, Berlin
Carbopol [®] 980	Goodrich, Neuss
Carboxyethyl- β -cyclodextrin	Cyclolab, Budapest, Ungarn
β -Cyclodextrin	Wacker Chemie AG, München
β -Cyclodextrin-Polymer (highly soluble)	Cyclolab, Budapest, Ungarn
Dickflüssiges Paraffin	Parafluid, Hamburg
Diethylether	Merck, Darmstadt
Diisopropyladipat	Dragocco, Holzminden
1.8-Dimethyl- β -cyclodextrin (Dimeb)	Wacker Chemie AG, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dioxan	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Glycerolmonostearat	Henkel, Düsseldorf
Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	Wacker Chemie AG, München
Isopropylmyristat (IPM)	Merck, Darmstadt

Substanzen	Bezugsquelle
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lipoid S 100, Sojalecithin	Lipoid GmbH, Ludwigshafen
Maltosyl- β -Cyclodextrin	Ensuiko Sugar Ref. Co., Ltd., Yokohama, Japan
Methanol	Riedel-de Haen, Hannover
Methylprednisolonaceponat (MPA)	Schering AG, Berlin
mikrokristallines Wachs	Astor-Stag SA, Eupen, Belgien
mittelkettige Triglyceride (Miglyol [®] 812)	Höls AG, Witten
Natriumazid	Riedel-de Haen, Hannover
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
n-Heptan	Merck, Darmstadt
Plastibase [®]	Caelo, Hilden
Polyoxyethylen-2-stearylalkohol (Brij [®] 72)	ICE, Essen
Polyvinylpyrrolidon (PVP) Kollidon [®] 12 PF	BASF, Ludwigshafen
Propylenglycol	Merck, Darmstadt
Psorcutan [®]	Leo, Kopenhagen, Dänemark
Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
Silikonöl AK 350	Wacker Chemie AG, München
Softisan [®] 649	Höls, AG, Witten
Sojaöl AK 350	Wacker Chemie AG, München
Toluol	Merck, Darmstadt
Weißes Vaseline	Esso AG, Hamburg

Alle verwendeten Chemikalien und Stoffe haben entweder Arzneibuchqualität oder entsprechen den Anforderungen von Prüfspezifikationen der Schering AG Berlin.

4.2 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Ultrazentrifuge	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
IKA TER 2 Temperierbad/Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Telesystem 605 EM/FT 200	H+P Labortechnik GmbH, München
500 MHz-Spektrometer, Typ AMX 500	Bruker, Karlsruhe
Lichtmikroskop Zeiss Axioplan mit installierter THMS 600 Heizkammer	Carl Zeiss, Oberkochen
Thermoanalytisches System TA 8000 mit Meß-Modul DSC 820 und Datenstation TAS 810	Mettler, Gießen
β -Szintillator, Betaszint BF 5000/300	Berthold, Wildbad
Durchflußwasserbad Typ 001 3292	Haake, Karlsruhe
Sonorex Super Ultraschallbad RK 103H	Bandelin Elec., Berlin
Rüttelapparatur SM	unbekannt
Colora Gefrierschrank UF 85-300 S	Colora Meßtechnik GmbH, Lorch
Gefriertrocknungsanlage Lyosystem GT3	Leybold-Heraeus, Köln
Submicron Particle Sizer, Autodilute, Model 370 (PCS)	Nicomb PSS, Santa Barbara, USA
Rotavapor®-R	Fa. Büchi, Flawil, Schweiz
Millipore "high press filter holder"	Millipore Corporation, Milford, USA
IKA Rührgerät RW 20 DZM mit Flächen- bzw. Flügelrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Celluloseacetat-Filter	Sartorius®, Göttingen
Polycarbonat-Filter	Nucleopore®, Costar, Tübingen
Isokratisches HPLC-Komponentensystem	siehe 4.3.10
NMR-Spektrometer AMX 500	Bruker, Karlsruhe
Rotationsviskosimeter Schweiz	Fa. Mettler, Schwerzenbach, Schweiz
Rheomat 115	
Thermostat Rheotherm 115	
Rheoanalyser	

Meßsystem MS 114

EDV-System, Software SWR 37

Für die In-vitro-Liberationsuntersuchungen gelangten zwei Franz-Diffusionszellsysteme des Herstellers *Crown Glass Co. Inc.* (Sommerville, NJ, USA) zum Einsatz. Die Apparaturen unterscheiden sich vorrangig in ihren Dimensionen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Franz-Diffusionszellsysteme

	Apparatur 1	Apparatur 2
Diffusionszelltyp	Franz-Zelle FDC-400 Improved flat ground	Franz-Zelle FDC-400 Improved flat ground
Membrandurchmesser	9 mm	25 mm
Membranfläche	0,64 cm ²	4,9 cm ²
Probenmenge	ca. 300 mg	ca. 400 mg
Schichtdicke (Probe)	0,4-0,7 cm	~1 mm
Volumen des Akzeptors	4 ml	18,5 ml
Versuchsaufbau	9 Franz-Zellen / Konsole	6 Franz-Zellen / Konsole

4.3 Methoden

4.3.1 Herstellung wässriger Lösungen des Calcitriol-Analogon (CA) mit Cyclodextrinen

Zur Herstellung der wässrigen Lösungen vom CA mit Dimeb bzw. G₂-β-CD wurden 3,0 g (\cong 1%) bzw. 3,6 g (\cong 1,2%) Cyclodextrin in einen Jodzahlkolben mit Schliff eingewogen und in 300 ml gereinigtem Wasser im Ultraschallbad -zur besseren Benetzung- gelöst. Sodann wurden jeweils 15,0 mg CA-Substanz unter Rühren mittels Magnetrührer den Lösungen zugegeben. Anschließend wurde mit Hilfe einer Rüttelapparatur agitiert bis klare Lösungen entstanden.

4.3.2 Herstellung von Liposomen

Zur Herstellung der Liposomen wurden 35 g Sojalecithin Lipoid S 100 bei 60°C mit 200 ml Ethanol (96 %) in einem 2 L-Rundkolben zur Lösung gebracht. Anschließend wurde die Lipoidlösung mittels Rotationsverdampfer bei 60°C auf dem Wasserbad zu einem Film, der sich an der Wandung des Kolbens niederschlug, eingeengt. Der Film wurde in ca. 300 ml gereinigtem Wasser dispergiert. Die Suspension wurde 6 x über Polycarbonat-Filter (s.u.) mit einem Millipore "high press filter holder" extrudiert:

Porendurchmesser	Preßdruck
1,0 µm	2 MPa
0,6 µm	< 2 MPa
0,4 µm	< 2 MPa
0,2 µm	6 MPa
0,1 µm	8 MPa
0,05 µm	6 MPa

Der mittlere Vesikeldurchmesser und die relative Standardabweichung der Liposomen-größenverteilung wurde mit Hilfe der Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS), einem Verfahren der quasielastischen Lichtstreuung, gemessen. Daraus resultierte eine mittlere Vesikelgröße von 68 nm (Vk:23,9 %). Zuletzt erfolgte die Abfüllung der kolloid-dispersen Lösung über einen sterilen Druckfilter (0,2 µm Celluloseacetat) in 100 ml-Glasvials.

Zur Beladung der Liposomen wurden 5,0 mg CA in einen Jodzahlkolben eingewogen. Nach Zugabe von 100 ml wässriger Liposomendispersion (10 % Lipidanteil) wurde 24 h mittels Magnetrührer gerührt.

4.3.3 Herstellung fester Kavitate

Die Herstellung der Kavitate mit nativem β -CD durch Kopräzipitation wurde in Anlehnung an die Herstellung des Einschlusses von Vitamin D₃ in β -CD nach [164] durchgeführt. Dafür wurden 20 ml Ethanol (60 %) in einem Jodzahlkolben auf 60°C erwärmt. Darin wurden 50 mg ($\approx 0,1$ mmol) CA unter Rühren vollständig gelöst. 600 mg ($\approx 0,53$ mmol) β -Cyclodextrin wurden zugefügt und mittels Magnetrührer bis zum Entstehen einer klaren Lösung gerührt.

Die Kühlung der Lösung verlief nach folgendem Gradienten (schematische Darstellung):



Die Ausbeute an getrocknetem Kopräzipitat bei diesem Verfahren betrug ca. 70-80 %, nach Filtration des gefällten Produktes (Nutsche). Das Produkt wurde über Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet und mehrmals mit 1 ml Aceton gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgte in Glasvials bei 6-8°C unter Lichtausschluß.

Für die weiteren eingesetzten Cyclodextrine (Tabelle 13) gelangte die Knetmethode zur Anwendung. Eine definierte Menge an Cyclodextrin wurde in einem Porzellanmörser vorgelegt und mit dem jeweiligen Lösungsmittel angefeuchtet (ca. 0,2-0,5 ml), so daß eine pastöse Masse entstand. Eine stöchiometrische Menge CA wurde hinzugegeben und mittels Pistill eingearbeitet. Es wurde geknetet, bis die Beschaffenheit der Masse weiteres Kneten nicht mehr zuließ oder die Masse trocken war. Im Falle von CE-β-CD und HP-β-CD(1) und HP-β-CD(2) war ein Nachfeuchten notwendig, um eine gleichmäßige Durchmischung zu erhalten. In die Untersuchungen gelangte nur HP-β-CD(2). Die Produkte wurden im Mörser über Phosphorpentoxid im Vakuum mindestens 12 h getrocknet. Anschließend wurde mehrmals mit 1 ml gekühltem Ether gewaschen. Die Lagerung erfolgte in Glasvials bei 6-8°C unter Lichtausschluß.

Tabelle 13: Herstellungsverfahren zur Bildung fester Kavitate

	Cyclodextrin- menge	Wirkstoff- menge	Lösungs- mittel	Knet- dauer	Beschaffen- heit	Literat. Bezug
Dimeb	1,042 g (0,8 mmol)	0,1974 g (0,4 mmol)	Ethanol 96%	20 min.	klebrig, honigartig	[165]
CE-β-CD	0,5103 g (0,4 mmol)	0,0995 g (0,2 mmol)	Methanol	10 min.	klebrig, hart	[96]
G₂-β-CD	1,2185 g (0,8 mmol)	0,199 g (0,4 mmol)	Ethanol 96%	5 min.	pulvrig	[165]
β-CD- Polymer	0,8656 g (ca. 0,2 mmol)	0,100 g (0,2 mmol)	Ethanol 96%	5 min.	klebrig, fest	[165]
HP-β-CD(1)	0,3091 g (0,2 mmol)	0,099 g (0,1 mmol)	Wasser	2 min.	hart	[96]
HP-β-CD(2)	0,3011 g (0,2 mmol)	0,049 g (0,1 mmol)	Methanol/ Wasser 1:1	2 min.	hart	[166]

Als weiteres Verfahren für die Präparation von G₂-β-CD-Kavitaten diene die Methode nach Koizumi et al. [167]. Dazu wurden 0,225 g (\approx 0,15 mmol) G₂-β-CD und 0,075 g (\approx 0,15 mmol) CA zu 1 ml Wasser gegeben und die Mischung bei 30°C während 24 h mittels Magnetrührer gerührt. Die Mischung wurde unter Druck (N₂) durch einen Polycarbonat-Filter (0,2 µm) filtriert, anschließend 12 h im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet und unter Lichtausschluß bei 6-8°C in Glasvials gelagert.

Zur Herstellung von Dimeb-Kavitaten wurde darüber hinaus die Lyophilisationsmethode herangezogen [76]. Dazu wurden 3,93 g (\approx 2,98 mmol) Dimeb in 100 ml gereinigtem Wasser unter Verwendung eines Ultraschallbades gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,209 g (\approx 0,42 mmol) CA unter Agitation (48 h Schütteln mittels Rüttelapparatur) bis zum Erreichen der maximalen Löslichkeit. Die Dispersion wurde filtriert und das Filtrat in einer Metallkruke bei -79°C in einem Gefrierschrank eingefroren. Die Lyophilisation erfolgte 24 h mittels Gefriertrocknungsanlage Lyosystem GT3. Es resultierte ein lockeres Produkt, das sich leicht aus der Kruke entnehmen ließ. Nach mehrmaligem Waschen mit jeweils 1 ml gekühltem Ether erfolgte die Lagerung in Glasvials bei 6-8°C.

4.3.4 Herstellung physikalischer Mischungen

Die physikalischen Mischungen der sechs Cyclodextrine mit CA wurden für Freisetzungsversuche im analogen molaren Verhältnis, entsprechend den jeweiligen Kavitaten durch fünfminütiges Verreiben der Substanzen im Mörser mittels Pistill hergestellt. Für DSC-Untersuchungen wurden Arzneistoff und Cyclodextrin im Aluminiumtiegel übereinander geschichtet und mit einem Stempel angedrückt.

4.3.5 Beschichtung der Cuprophan-Membran mit Silikonöl

Zur Beschichtung der Cuprophan-Membran mit Silikonöl für die In-vitro-Freisetzungsversuche mit Hydrogelen wurde zunächst eine 2%ige Lösung von Silikonöl (AK 350) in Diethylether hergestellt. Die trockene Cuprophan-Membran wurde für ca. 5 Sekunden in diese Lösung getaucht und anschließend zum Abdampfen des Ethers ausgebreitet, bevor sie auf die Rezeptorkammer aufgespannt wurde.

4.3.6 Herstellung der halbfesten Zubereitungen

Alle verwendeten Verum- und Placebo-Salben auf der Grundlage von Vaseline, Plastibase oder Triglyceriden wurden nach folgendem Prinzip hergestellt: Die verwendeten Hilfsstoffe bzw. Grundlagen wurden in Stahlkruken eingewogen und bei 60-70°C im Paraffinbad klargeschmolzen. Anschließend wurde die Fettschmelze unter Rühren (ca. 90 Upm) mittels elektrischem Rührwerkzeug (Flächenrührer) kaltgerührt.

Für die Verumansätze bis 100 g dienten Fantaschalen mit Pistill zur Herstellung. Die für die Verumkonzentration erforderliche Menge an Arzneistoff bzw. Kavitat wurde vorgelegt und in kleiner Menge Placebo suspendiert (Stammverreibung). Anschließend wurde die weitere Grundlage in kleinen Anteilen in die Gesamtmenge eingearbeitet.

Die Herstellungsverfahren wurden durch makroskopische und mikroskopische Beurteilung der Produkte auf Qualität geprüft. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß in 50 g Kruken (Fa. Aponorm).

Die Herstellung der verschiedenen Polyacrylatgele ist in Abb. 40 schematisch dargestellt.

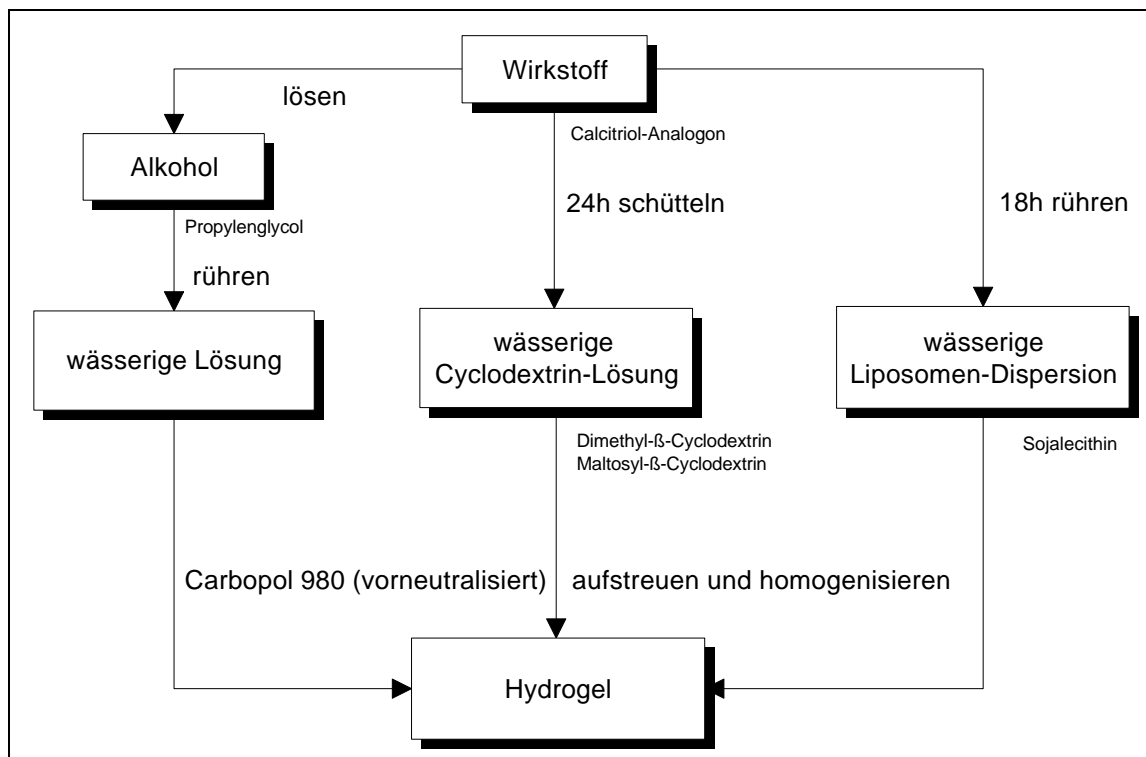


Abb. 40: Hydrogelherstellung

Dazu wurden 1,8 g vorneutralisiertes Carbopol 980 (380 g Methanol + 30 g NaOH-Plätzchen + 100 g Carbopol 980) nach Aufstreuen und Benetzung in die (jeweils 300 g) vorbereiteten Lösungen von CA + Cyclodextrin (Herstellung wässriger Lösungen des Calcitriol-Analogen (CA) mit Cyclodextrinen, 4.3.1), Propylenglycol / Wasser (5:95) oder der Liposomendispersion (Herstellung von Liposomen, 4.3.2) mittels elektrischen Flügelrührers eingerührt (ca. 120 Upm). Nach Auflösen des Gelbildners wurde 30 min unter Verwendung eines Flächenrührers homogenisiert (ca. 90 Upm), um ein gleichmäßiges Gelgerüst zu erhalten. Die Hydrogele wurden im Lichtmikroskop auf Gleichmäßigkeit des Gelgerüsts geprüft, indem auf Nichtvorhandensein ungelöster Polyacrylsäure geprüft wurde.

Die Herstellung der Liposomen-Hydrogele erforderte energischere Agitation (ca. 400 Upm) beim Auflösen und Homogenisieren von vorneutralisiertem Carbopol 980. Durch Anwesenheit der kolloid-dispersen Lipidphase (10%) war die Ausrichtung der Gelstruktur aufgrund mangelnder Benetzung und Lösung der Polyacrylsäure sonst nicht möglich. Dies hatte eine verstärkte Bildung von Luftblasen zur Folge, die sich im Vakuum entfernen ließen. Die Aufbewahrung erfolgte bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß in 50 g Kruken (Fa. Aponorm).

4.3.7 In-vitro-Liberationsuntersuchungen

Als In-vitro-Liberationsapparatur diente das Diffusionszellsystem nach Franz [41] in einer Konsole mit Rührvorrichtungen (Apparaturen 1 und 2, Tabelle 12). Die Akzeptorphase, auf $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ temperiert, wurde blasenfrei in das Zellkompartiment eingefüllt und bei 600 Upm mit Hilfe eines Rührmagneten durchmischt. Das zu prüfende Dermatum wurde in die offene Donatorvorrichtung der Zelle gebracht, indem die Prüfsubstanz auf die zuvor ca. 15 min mit Akzeptormedium getränkte Membran appliziert wurde. Dazu wurde eine aus Edelstahl angefertigte Schablone auf die auf eine Teflon®-Platte ausgebreitete Membran gelegt und mit Probe beladen. Anschließend konnte die präparierte Membran mittels Pinzette zwischen Donator- und Akzeptorvorrichtung positioniert werden. Die Probenentnahmen von jeweils 1 ml Akzeptorphase mittels Einmalspritze (Pharma-Plast, DK-Rodby) erfolgten über den Gesamtzeitraum von 6 h nach 30, 60, 120, 180, 240, (300) und 360 min. Das Akzeptorkompartiment wurde anschließend mit der jeweils aliquoten Menge des Akzeptormediums aufgefüllt.

Die mittels RP-HPLC (Gehaltsbestimmungen, 4.3.10) bestimmten Gehalte [$\mu\text{g/ml}$] wurden für die Darstellung der Freisetzungskurven der Arzneistoffe gegen die Wurzel aus der Zeit herangezogen [125]. Die Berechnung der tatsächlich freigesetzten Menge an Arzneistoff pro Zeiteinheit erfolgte kumulativ unter Berücksichtigung der Verdünnung durch die Probenentnahme mittels Gleichung 7.

Die Werte für die Plots wurden aus drei bzw. sechs separaten Diffusionszellen gemittelt sowie Standardabweichungen berechnet. Die Auswertung erfolgte durch lineare Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate des linearen Teils der Liberationskurve. Die Dokumentation und Umrechnung der gemessenen Flächenwerte erfolgte mit Hilfe der Software Access*Chrom und anschließender Dokumentation und Auswertung mit Microsoft Excel Version 5.0.

Gleichung 7

$Q_t = R_t - (R_t - 1) \cdot \frac{V_o - V_p}{V_o}$	Q_t : pro Zeitspanne freigesetzte Arzneistoffmenge
$a_t = Q_1 + Q_2 + \dots + Q_t$	R_t : im gesamten Prüfvolumen vorhandene Arzneistoffmenge
	V_o : Gesamtvolumen
	V_p : Probenvolumen
	a_t : Gesamtmenge an freigesetztem Arzneistoff zum Zeitpunkt t

4.3.8 Untersuchungen an Maushaut

Permeationsstudien mit tierischer Membran erfolgten unter Verwendung von intakter und gestrippter Bauchhaut (20fach mit Tesafilm®, Beiersdorf, Hamburg) haarloser Mäuse (Balb/c, nu/nu, Bomholtgard, Dänemark, 4-5 Wochen alt, weiblich) in Analogie ebenfalls mittels Franz-Diffusionszellensystemen (vgl. Abschnitt 4.2). ^3H -Methylprednisolonaceponat (^3H -MPA) wurde als 0,1 %ige Lösung, 0,1 %ige Salbe und 0,1 %ige Fettsalbe in einer Flächendosierung von 5 mg pro cm^2 Haut appliziert (n=6 oder n=8). Der Zeitverlauf der Radioaktivität, die in das Akzeptormedium von 3,7 ml BSA-Puffer³ (pH 7,4), bestehend aus 0,041 M Dinatriumhydrogenphosphat, 0,026 M Kaliumdihydrogenphosphat, 0,154 M Natriumchlorid, 0,015 M Natriumazid und 0,1 % (w/v) Rinderserumalbumin, permeierte,

³ es liegen "sink-Bedingungen" vor

wurde mit einem β -Szintillator gemessen. 10 ml Atomlicht (NEN, Boston) wurden zu Aliquots von 0,05 ml Akzeptorfluid zugegeben. Die Probenentnahmen von jeweils 50 μ l erfolgten über den Gesamtzeitraum von sechs Stunden nach 30, 60, 75, 120, 180, 240 und 360 Minuten. Das entnommene Probenvolumen wurde jeweils durch BSA-Puffer ersetzt. Die erhobenen Daten wurden für die Darstellung der Freisetzungsprofile von ^3H -MPA [%] gegen die Wurzel aus der Zeit herangezogen.

Am Ende des Experiments wurde der verbleibende Arzneistoff von der Hautoberfläche durch Abtupfen mit 5 Wattestäbchen entfernt. Im Falle der intakten Haut wurde das Stratum corneum mit 10 Tesafilmstreifen (s.o) entfernt.

Die Wattestäbchen und Tesafilmstreifen (5 Vials zu je 2 Abrissen) wurden mit je 10 ml TE Lösung (Toluol/Dioxan/Ethylacetat = 2:1:1, V/V) extrahiert und Aliquots von 0,1 ml (Wattepads) und 1 ml (Tesafilmstreifen) in 10 ml Atomlicht vermessen. Die Resthaut wurde in kleine Stücke zerschnitten und in 5 ml TE Lösung ebenfalls extrahiert.

Die Werte für die Plots wurden aus sechs oder acht separaten Diffusionszellen gemittelt sowie Standardabweichungen berechnet.

4.3.9 In-vivo-Untersuchungen

Die Placebo- und Verumformulierungen für das CA sowie die Psorcutan[®]-Grundlage wurden frisch hergestellt und innerhalb von 14 Tagen verwendet. Als Referenz dienten der Wirkstoff in Ethanol / Isopropylmyristat (95:5) sowie die kommerziell erhältliche Psorcutan[®]-Salbe.

Die Untersuchungen wurden am Rücken männlicher haarloser Mäuse (C_3H hr/hr, Bomholtgaard, Dänemark) durchgeführt (Körpergewicht: 21 bis 25 g). Die Mäuse trugen keine Halskrausen. An 11 aufeinanderfolgenden Tagen wurden 60 μ l der jeweiligen Formulierung auf ca. 20 cm^2 Rückenhaut aufgetragen und leicht einmassiert. Die Haut der in Einzelkäfigen gehaltenen Mäuse wurde nicht okkludiert. Die täglich applizierte Flächendosis des Wirkstoffs (0,005 %, 3 $\mu\text{g}/20 \text{ cm}^2/\text{Tag}$) war bei allen Versuchen konstant.

24 Stunden nach der letzten Behandlung wurden Hautbiopsien zur histomorphometrischen Untersuchung mittels Mikroskop entnommen. Die Werte für die Plots wurden aus jeweils sechs Hautbiopsien gemittelt sowie Standardabweichungen berechnet.

4.3.10 Gehaltsbestimmungen

Die quantitative Erfassung der Arzneistoffe erfolgte mittels Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC) und UV-Detektion. Dazu wurde ein Komponentensystem benutzt. Durch Flächenvergleich nach der Methode des externen Standards wurden die Konzentrationen der Arzneistoffe berechnet.

Die HPLC-Anlage besteht aus:

- HPLC Pumpe SDS 400 (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA),
- Autosampler Waters WISP 712 (Millipore Corporation, Milford, USA)
- UV/VIS-Detektor abi 783A (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA)
- Software Access*Chrom (Perkin Elmer Nelson Systems Inc., Cupertino, USA)
- Degasser (Optilab, Berlin)

Die verwendeten Parameter für die Bestimmung von Methylprednisolonaceponat waren:

- Stationäre Phase: Polygosil 60 C18, 5 µm, 250 mm × 4,0 mm (Optilab, Berlin)
- Mobile Phase: Methanol / Wasser (7:3, V/V)
- Durchflußrate: 2,0 ml/min
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Detektionswellenlänge: 242 nm
- Temperatur: Raumtemperatur

Die verwendeten Parameter für die Bestimmung des Calcitriol-Analogon waren:

- Stationäre Phase: Hypersil MOS, 3 µm, 250 mm×4,0 mm (Optilab, Berlin)
- Mobile Phase: Acetonitril / Wasser (1:1, V/V)
- Durchflußrate: 1,0 ml/min
- Injektionsvolumen: 100 µl
- Detektionswellenlänge: 264 nm
- Temperatur: 10°C

Zur Gehaltsbestimmung im Rahmen von In-vitro-Untersuchungen wurde die entnommene Akzeptorphase direkt in das HPLC-System eingespritzt. Der externe Standard wurde im gleichen Lösemittel gelöst.

Zur Gehaltsbestimmung vom CA in Salben wurden ca. 1 g Probe in 50 ml Jodzahlkolben gefüllt, mit 15 ml Heptan versetzt und mit 35,0 ml Methanol / Wasser (7:3, V/V) extrahiert (30 min Schütteln). Anschließend wurde der Jodzahlkolben bei 6°C mindestens 1 h stehen gelassen, da somit eine bessere Phasentrennung erfolgte. 1 ml aus der Methanol / Wasser-Phase wurde bei 10000 Upm 3 min in einer Ultrazentrifuge zur Abtrennung der Fettphase zentrifugiert. Die klare Lösung wurde anschließend mittels RP-HPLC untersucht. Der externe Standard wurde in Methanol / Wasser (7:3, V/V) gelöst.

Abb. 41 zeigt ein typisches Chromatogramm von CA in einer bei 25°C 6 Monate gelagerten V-Rezeptur.

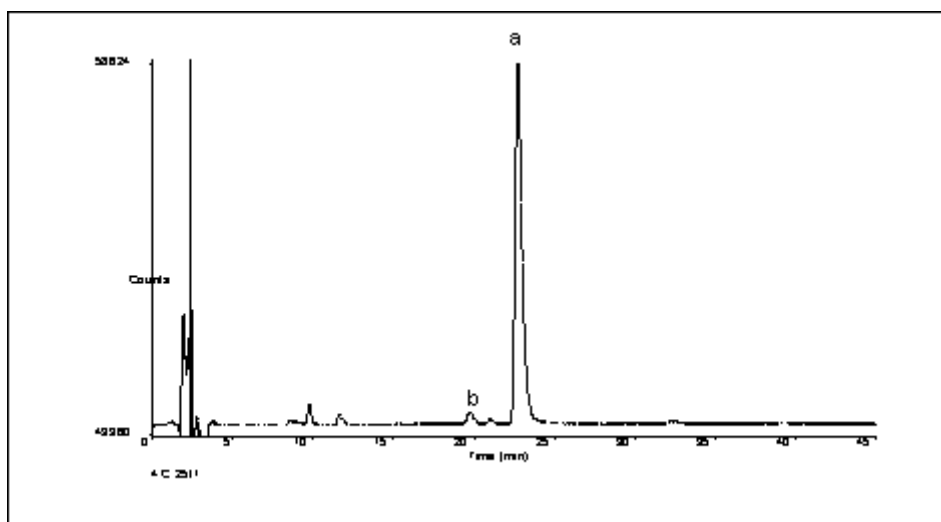


Abb. 41: Chromatogramm von CA (V-Rezeptur): a) CA, b) Prävitamin

4.3.11 Differential Scanning Calorimetrie (DSC)

Die thermoanalytischen Untersuchungen wurden als DSC-Messungen im Thermoanalytischen System TA 8000 bei hoher Empfindlichkeit durchgeführt. Die Thermo

gramme der Präparationen der CA / β -Cyclodextrin-Systeme wurden im Bereich von 20 bis 140°C in kalt verschweißten und anschließend 1 mm Durchmesser durchlochten Alutiegeln bei einer Heizrate von 10 K/min aufgenommen. Als Spülgas diente Stickstoff (50 ml/min). Als Probenmenge kamen jeweils ca. 5 mg Substanz zur Einwaage.

4.3.12 Licht- und Thermomikroskopie

Die Durchführung der thermomikroskopischen Untersuchungen erfolgte mit dem Lichtmikroskop Zeiss Axioplan mit installierter THMS 600 Heizkammer. Die Präparationen der CA / Cyclodextrin-Systeme wurden in Paraffin auf einem Objektträger aufgeschlemmt und bei einer Heizrate von 10 K/min im Bereich von 25 bis 140°C in 200facher Vergrößerung mittels Videokamera aufgezeichnet.

4.3.13 Phasenlöslichkeitsuntersuchungen

Die zur Sättigung des Wasservolumens von 10 ml erforderliche Menge an CA in Anwesenheit von Cyclodextrinen wurde anhand der Ergebnisse von Vorversuchen abgeschätzt. Durchschnittlich etwa dreimal soviel Prüfsubstanz wie die geschätzte Menge wurde in Reagenzgläser mit Schliff eingefüllt und mit 10 ml unterschiedlich konzentrierter Cyclodextrin-Lösungen befüllt. Die Gefäße wurden verschlossen und 24 h lang bei 25°C agitiert. Dazu diente ein Magnetrührer-Wasserbad-Telesystem 605 EM/FT 200. Nach Filtration der Suspensionen durch einen Membranfilter (0,45 μ m) wurde der Gehalt an CA mittels RP-HPLC bestimmt.

4.3.14 ^1H -NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR-Untersuchungen wurden mit einem 500 MHz-Spektrometer, Typ AMX 500 durchgeführt. Die frisch präparierten Kavitate wurden in verschiedenen Lösungsversuchen in 0,5 ml des Lösungsmittels gelöst bzw. dispergiert. Alle Spektren wurden mit einem BB Invers-Probenkopf (5 mm) bei 300 K mit Lösemittelunterdrückung durch Vorsättigung der entsprechenden Signale aufgenommen. Für die NOESY- und ROESY-Spektren wurden die Meßdaten vor der Fouriertransformation mit Sineball-Funktionen

multipliziert und nach der Transformation nicht symmetrisiert, bei den COSY-Spektren wurden sie anschließend symmetrisiert.

4.3.15 Rheologische Untersuchungen

Für rheologische Untersuchungen diente ein Rotationsviskosimeter, welches sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

- Rheomat 115
- Thermostat Rheotherm 115
- Rheoanalyser
- Meßsystem MS 114
- EDV-System, Software SWR 37

Prinzip der Methode:

Ein sich in der Probe befindender Meßkörper wird durch einen Elektromotor angetrieben. Das von der Probe auf den Meßkörper ausgeübte Bremsmoment wird im Meßkopf des Rheomats gemessen. Die in der Probe herrschende Schergeschwindigkeit ist eine Funktion der Drehzahl des Meßkörpers und die Schubspannung eine Funktion des Bremsmoments. Aus diesen beiden Größen läßt sich die Viskosität bzw. das Fließverhalten der Probe ableiten.

Durchführung:

30 Minuten vor Arbeitsbeginn wurden der Thermostat ($25 \pm 0,2^\circ\text{C}$) und Rheoanalyser und das EDV-System eingeschaltet. Zunächst wurde der Meßkörper in das Meßbecheroberteil eingeführt. Anschließend wurde das Meßbecheroberteil von unten mit Probe gefüllt, wobei gleichzeitig der Meßkörper langsam herausgezogen wurde, bis der Meßbecher zur Hälfte gefüllt war. Oberteil, Unterteil und Dichtungsgummi wurden zusammengeschraubt und von unten in die Temperierkammer mittels Überwurfmutter arretiert. Die Probe wurde auf $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ temperiert (ca. 30 min). Anschließend wurde die Probe mit steigender Schergeschwindigkeit (Meßrampe: $D = 0$ bis 1006 s^{-1} / 180 sec) unterworfen. Zur Aufnahme der Meßkurven sowie zur Auswertung diente die Software SWR 37, Fa. Contraves.

Auswertung:

Für die Berechnung der Viskosität wurden max. 30 Meßpunkte verwendet, wobei nur der untere Teil der Aufwärtskure der Auswertung diene (20 bis 600 s⁻¹). Als Regressionsmodell wurde nach Methode der kleinsten Quadrate die Gleichung nach Ostwald (Gleichung 5) als Berechnungsgrundlage herangezogen.

4.3.16 Statistische Prüfverfahren

Eine Signifikanzprüfung von Meßpunkten erfolgte nach Prüfung auf Varianzhomogenität und Normalverteilung mittels t-Test nach Student und wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (P) von 1 % bzw. 5 % durchgeführt [168].

5 Tabellenanhang

Berechnung der Stabilitätskonstanten (pH=6,5, T=25°C)

System Calcitriol-Analogon / β -CD		System Calcitriol-Analogon / Polymer- β -CD	
Calcitriol-Analogon Mittelwerte [mol/L]	CD-Zusatz [mol/L]	Calcitriol-Analogon Mittelwerte [mol/L]	CD-Zusatz [mol/L]
0,0000021	0	0,0000021	0
0,0313632	0,35240	0,0000481	0,00235
0,0472504	0,52900	0,0001828	0,00471
-	-	0,0002148	0,00706
-	-	0,0003244	0,00941
-	-	0,0004224	0,01176
-	-	0,0005339	0,01412
Steigung:	0,08512	Steigung:	0,03774
K [L/mol]	37989	K [L/mol]	17715

System Calcitriol-Analogon / DIMEB		System Calcitriol-Analogon / G ₂ - β -CD	
Calcitriol-Analogon Mittelwerte [mol/L]	CD-Zusatz [mol/L]	Calcitriol-Analogon Mittelwerte [mol/L]	CD-Zusatz [mol/L]
0,0000021	0	0,0000021	0
0,00045520	0,007634	0,0002162	0,00669
0,00159344	0,015267	0,0005362	0,01338
0,00303802	0,022900	0,0009864	0,02007
0,00425892	0,030534	0,0015817	0,02676
0,00500282	0,038168	0,0020183	0,03345
0,00582613	0,045801	-	-
Steigung:	0,13677	Steigung:	0,06248
K [L/mol]	57612	k [L/mol]	28575

Auswertungsbeispiel: Freisetzung von CA aus der Triglycerid-Kohlenwasserstoff-Grundlage unter Einfluß von Dimeb

Auswertung der externen Standards

Standard Nr.	Konz.(µg/ml):	FE	korr. FE (1,0µg/ml)
1,1,1	0,592	90348	152502
1,1,2	0,592	90619	152959
1,1,3	0,592	NV	NV
1,2,1	0,592	94819	160048
1,2,2	0,592	94295	159164
1,2,3	0,592	94891	160170
1,3,1	0,592	90489	152740
1,3,2	0,592	90380	152556
1,3,3	0,592	90165	152193
Mittelwert:		92001	155291
Standardabweichung:			3746
Rel. Standardabweichung:			2,41%

Standard Nr.	Konz.(µg/ml):	FE	korr. FE (1,0µg/ml)
4,1,1	0,0809	11727	144993
4,1,2	0,0809	12119	149839
4,1,3	0,0809	11868	146736
4,2,1	0,0809	11129	137599
4,2,2	0,0809	11337	140171
4,2,3	0,0809	10431	128969
4,3,1	0,0809	11210	138600
4,3,2	0,0809	11391	140838
4,3,3	0,0809	11087	137080
Mittelwert:		11367	140536
Standardabweichung:			6156
Rel. Standardabweichung:			4,38%

2,1,1	0,494	71297	144414
2,1,2	0,494	69844	141471
2,1,3	0,494	74940	151793
2,2,1	0,494	74709	151325
2,2,2	0,494	74860	151631
2,2,3	0,494	73152	148171
2,3,1	0,494	NV	NV
2,3,2	0,494	NV	NV
2,3,3	0,494	NV	NV
Mittelwert:		73134	148134
Standardabweichung:			4337
Rel. Standardabweichung:			2,93%

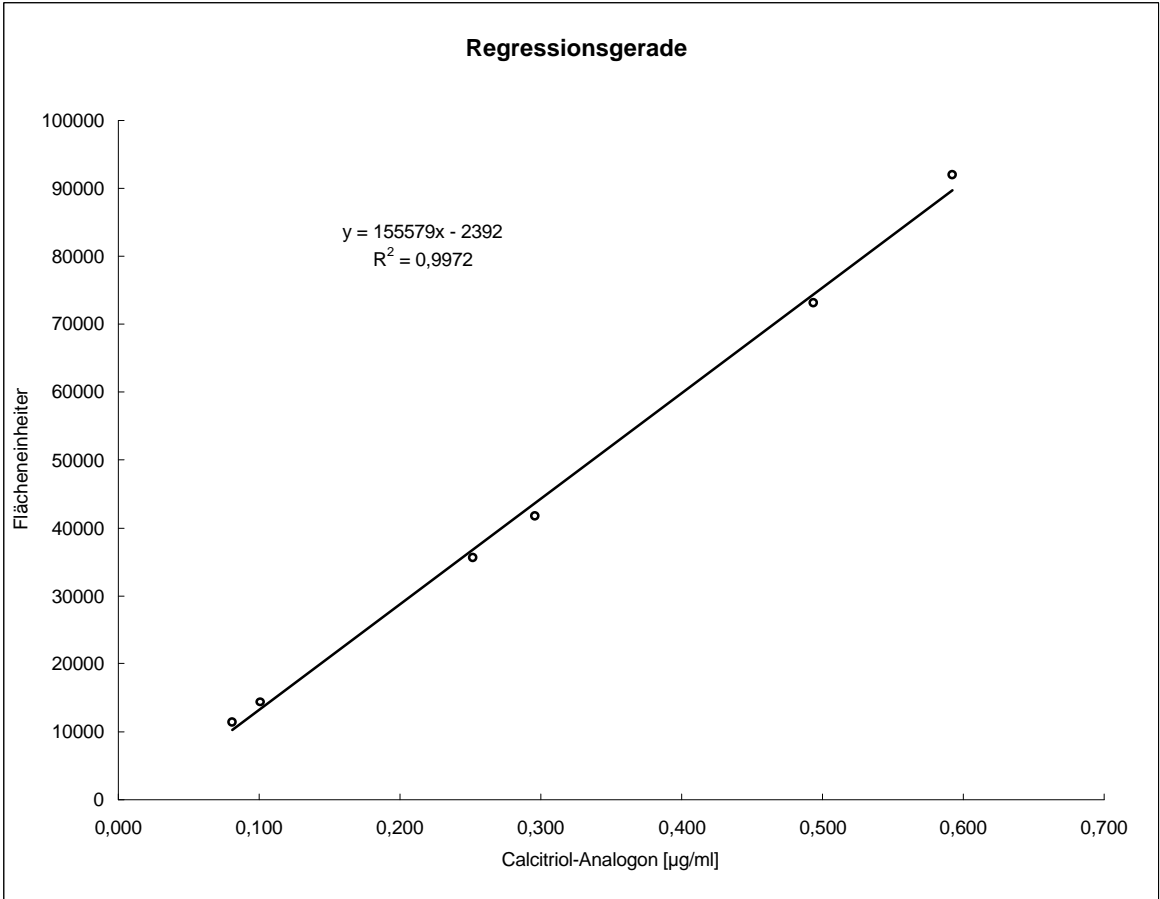
5,1,1	0,2519	32559	129279
5,1,2	0,2519	35102	139377
5,1,3	0,2519	34979	138888
5,2,1	0,2519	36524	145023
5,2,2	0,2519	35001	138976
5,2,3	0,2519	32231	127977
5,3,1	0,2519	38975	154755
5,3,2	0,2519	37530	149017
5,3,3	0,2519	37753	149903
Mittelwert:		35628	141466
Standardabweichung:			9118
Rel. Standardabweichung:			6,45%

3,1,1	0,2962	40701	137401
3,1,2	0,2962	43060	145365
3,1,3	0,2962	41145	138900
3,2,1	0,2962	38523	130049
3,2,2	0,2962	39652	133860
3,2,3	0,2962	41415	139812
3,3,1	0,2962	43259	146037
3,3,2	0,2962	44204	149227
3,3,3	0,2962	43361	146381
Mittelwert:		41702	140781
Standardabweichung:			6426
Rel. Standardabweichung:			4,56%

6,1,1	0,1011	14794	146330
6,1,2	0,1011	14761	146004
6,1,3	0,1011	14477	143195
6,2,1	0,1011	15183	150178
6,2,2	0,1011	14070	139169
6,2,3	0,1011	14036	138833
6,3,1	0,1011	14567	144085
6,3,2	0,1011	14367	142107
6,3,3	0,1011	13143	130000
Mittelwert:		14378	142211
Standardabweichung:			5800
Rel. Standardabweichung:			4,08%

Konz.(µg/ml):	FE	Standard Nr.:	korr. FE (1,0µg/ml)
0,0809	11367	1	155291
0,1011	14378	2	148134
0,2519	35628	3	140781
0,2962	41702	4	140536
0,494	73134	5	141466
0,592	92001	6	142211
Mittelwert:			144737
s(n-1)			5887
VK:			4,07%

NV= Nicht verfügbar



Regressions-Statistik		Auswertung der Proben	
Multipler Korrelationskoeffizient	0,99861	Berechnung: c(µg/ml) = -----	FE (Probe)
Bestimmtheitsmaß	0,99722		
Adjustiertes Bestimmtheitsmaß	0,99653		korrr. FE (Std.)
Standardfehler	1895		
Beobachtungen	6		

Freisetzung von Calcitriol-Analogon aus TK-Formulierung

Freisetzung nach 30 Minuten

Zelle Nr.	Inj. Nr.	FE	µg/ml	Mittelwert:
A	1	8357	0,058	0,052
	2	6481	0,045	
	3	7785	0,054	
B	1	9493	0,066	0,067
	2	9131	0,063	
	3	10624	0,073	
C	1	9056	0,063	0,062
	2	8920	0,062	
	3	9001	0,062	
D	1	9154	0,063	0,064
	2	9411	0,065	
	3	9359	0,065	
E	1	9032	0,062	0,067
	2	10182	0,070	
	3	9914	0,068	
F	1	9837	0,068	0,071
	2	10106	0,070	
	3	10765	0,074	
			Mittelwert:	0,0640
			s(n-1):	0,0065
			VK:	10,16%

Freisetzung nach 60 Minuten

Zelle Nr.	Inj. Nr.	FE	µg/ml	Mittelwert:
A	1	15325	0,106	0,103
	2	12790	0,088	
	3	16597	0,115	
B	1	18267	0,126	0,124
	2	18106	0,125	
	3	17427	0,120	
C	1	15581	0,108	0,109
	2	17012	0,118	
	3	14665	0,101	
D	1	14518	0,100	0,106
	2	14270	0,099	
	3	17081	0,118	
E	1	15264	0,105	0,102
	2	14270	0,099	
	3	14623	0,101	
F	1	17122	0,118	0,111
	2	15372	0,106	
	3	15681	0,108	
			Mittelwert:	0,1090
			s(n-1):	0,0081
			VK:	7,42%

Freisetzung nach 120 Minuten

Zelle Nr.	Inj. Nr.	FE	µg/ml	Mittelwert:
A	1	26710	0,185	0,189
	2	27173	0,188	
	3	27976	0,193	
B	1	28870	0,199	0,207
	2	28458	0,197	
	3	32472	0,224	
C	1	32056	0,221	0,223
	2	32279	0,223	
	3	32466	0,224	
D	1	26428	0,183	0,185
	2	26878	0,186	
	3	26934	0,186	
E	1	27277	0,188	0,187
	2	26759	0,185	
	3	27304	0,189	
F	1	28880	0,200	0,193
	2	27142	0,188	
	3	27616	0,191	
			Mittelwert:	0,1972
			s(n-1):	0,0148
			VK:	7,53%

Freisetzung nach 180 Minuten

Zelle Nr.	Inj. Nr.	FE	µg/ml	Mittelwert:
A	1	38856	0,268	0,268
	2	37300	0,258	
	3	39997	0,276	
B	1	46668	0,322	0,306
	2	43988	0,304	
	3	42247	0,292	
C	1	42038	0,290	0,286
	2	38474	0,266	
	3	43577	0,301	
D	1	36081	0,249	0,250
	2	36061	0,249	
	3	36559	0,253	
E	1	37054	0,256	0,255
	2	36733	0,254	
	3	37033	0,256	
F	1	37943	0,262	0,260
	2	37318	0,258	
	3	37824	0,261	
			Mittelwert:	0,2709
			s(n-1):	0,0212
			VK:	7,83%

Freisetzung nach 240 Minuten

Zelle Nr.	Inj. Nr.	FE	µg/ml	Mittelwert:
A	1	51391	0,355	0,327
	2	45881	0,317	
	3	44593	0,308	
B	1	51889	0,359	0,373
	2	57816	0,399	
	3	52329	0,362	
C	1	46483	0,321	0,325
	2	48828	0,337	
	3	45894	0,317	
D	1	45376	0,314	0,310
	2	44407	0,307	
	3	44794	0,309	
E	1	46444	0,321	0,314
	2	45101	0,312	
	3	44877	0,310	
F	1	46120	0,319	0,326
	2	47960	0,331	
	3	47501	0,328	
			Mittelwert:	0,3292
			s(n-1):	0,0226
			VK:	6,88%

Freisetzung nach 300 Minuten

Zelle Nr.	Inj. Nr.	FE	µg/ml	Mittelwert:
A	1	60246	0,416	0,399
	2	59849	0,414	
	3	53106	0,367	
B	1	67047	0,463	0,445
	2	60844	0,420	
	3	65158	0,450	
C	1	58790	0,406	0,405
	2	58127	0,402	
	3	59070	0,408	
D	1	50074	0,346	0,347
	2	50029	0,346	
	3	50773	0,351	
E	1	51874	0,358	0,358
	2	51647	0,357	
	3	52139	0,360	
F	1	52498	0,363	0,363
	2	52870	0,365	
	3	52444	0,362	
			Mittelwert:	0,3864
			s(n-1):	0,0367
			VK:	9,49%

Freisetzung nach 360 Minuten

Zelle Nr.	Inj. Nr.	FE	µg/ml	Mittelwert:
A	1	65691	0,454	0,443
	2	65292	0,451	
	3	61349	0,424	
B	1	71165	0,492	0,475
	2	69129	0,478	
	3	66134	0,457	
C	1	62498	0,432	0,426
	2	62723	0,433	
	3	59769	0,413	
D	1	58029	0,401	0,398
	2	57065	0,394	
	3	57598	0,398	
E	1	57796	0,399	0,395
	2	57526	0,397	
	3	56061	0,387	
F	1	58088	0,401	0,396
	2	57173	0,395	
	3	56602	0,391	
			Mittelwert:	0,4221
			s(n-1):	0,0326
			VK:	7,73%

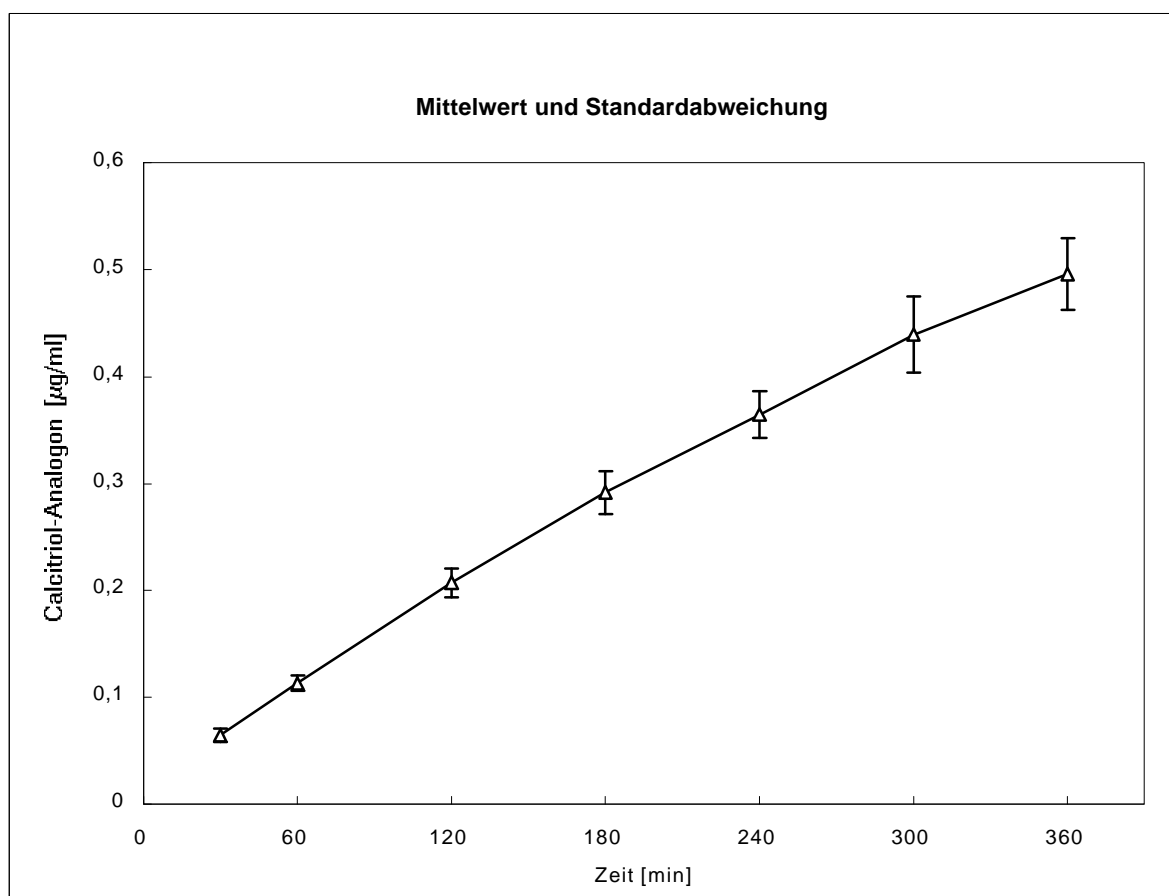
Zeit (min)	Zelle Nr. A				Zelle Nr. B			
	Konz. (µg/ml)	pro Zeitspanne freigesetzt (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/cm ²)	Konz. (µg/ml)	pro Zeitspanne freigesetzt (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/cm ²)
	30 min.	0,052	0,052	0,011	0,067	0,067	0,067	0,014
	60 min.	0,103	0,054	0,106	0,124	0,060	0,128	0,026
	120 min.	0,189	0,091	0,197	0,207	0,090	0,217	0,044
	180 min.	0,268	0,089	0,286	0,306	0,110	0,328	0,067
	240 min.	0,327	0,074	0,360	0,373	0,084	0,411	0,084
	300 min.	0,399	0,090	0,450	0,445	0,092	0,503	0,103
	360 min.	0,443	0,066	0,515	0,475	0,055	0,558	0,114

Zeit (min)	Zelle Nr. C				Zelle Nr. D			
	Konz. (µg/ml)	pro Zeitspanne freigesetzt (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/cm ²)	Konz. (µg/ml)	pro Zeitspanne freigesetzt (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/cm ²)
	30 min.	0,062	0,062	0,013	0,064	0,064	0,064	0,013
	60 min.	0,109	0,050	0,112	0,106	0,045	0,109	0,022
	120 min.	0,223	0,120	0,232	0,185	0,085	0,194	0,040
	180 min.	0,286	0,075	0,307	0,250	0,076	0,270	0,055
	240 min.	0,325	0,055	0,362	0,310	0,073	0,343	0,070
	300 min.	0,405	0,098	0,460	0,347	0,054	0,397	0,081
	360 min.	0,426	0,043	0,502	0,398	0,069	0,466	0,095

Zeit (min)	Zelle Nr. E				Zelle Nr. F			
	Konz. (µg/ml)	pro Zeitspanne freigesetzt (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/cm ²)	Konz. (µg/ml)	pro Zeitspanne freigesetzt (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/ml)	freigesetzte Gesamt- menge (µg/cm ²)
	30 min.	0,067	0,071	0,014	0,071	0,071	0,071	0,014
	60 min.	0,102	0,038	0,109	0,111	0,044	0,115	0,023
	120 min.	0,187	0,091	0,200	0,193	0,088	0,202	0,041
	180 min.	0,255	0,078	0,278	0,260	0,078	0,281	0,057
	240 min.	0,314	0,073	0,351	0,326	0,080	0,360	0,074
	300 min.	0,358	0,061	0,412	0,363	0,055	0,415	0,085
	360 min.	0,395	0,056	0,468	0,396	0,052	0,467	0,095

Zusammenfassung der Zellen A...F

Zeit	Zelle A	Zelle B	Zelle C	Zelle D	Zelle E	Zelle F	Standard- abweichung s	Mittelwert
30 min.	0,052	0,067	0,062	0,064	0,071	0,071	0,006	0,065
60 min.	0,106	0,128	0,112	0,109	0,109	0,115	0,007	0,113
120 min.	0,197	0,217	0,232	0,194	0,200	0,202	0,013	0,207
180 min.	0,286	0,328	0,307	0,270	0,278	0,281	0,020	0,292
240 min.	0,360	0,411	0,362	0,343	0,351	0,360	0,022	0,364
300 min.	0,450	0,503	0,460	0,397	0,412	0,415	0,036	0,439
360 min.	0,515	0,558	0,502	0,466	0,468	0,467	0,033	0,496



6 Literatur

-
- 1 NIEDNER R., ZIEGENMEYER J.
Dermatika, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1992, SS. 287-299
 - 2 LANDMANN L.
Die Permeabilitätsbarriere der Haut, Pharm. unserer Zeit **20**, 155ff (1991)
 - 3 SAMS W.M., LYNCH P.J.
Principles and Practice of Dermatology, Churchill Livingstone New York Edinburgh 1996, SS. 1-6
 - 4 MOLL F., BENDER H.
Biopharmazeutische Untersuchungsverfahren, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1994, S. 68
 - 5 SHAH V.P., BEHL C.R., FLYNN, G.L., HIGUCHI W.I., SCHAEFER H.
Principles and criteria in the development and optimization of topical therapeutic products, Int. J. Pharm. **82**, 21-28 (1992)
 - 6 ZESCH A.
Zur Bioäquivalenz und Bioverfügbarkeit topisch applizierter Arzneimittel, Pharm. Ind. **50**, 746-749 (1988)
 - 7 TAKAHACHI M., MACHIDA Y., MARKS R.
Measurement of turnover time of stratum corneum using dansyl chloride fluorescence, J. Soc. Cosmet. Chem. **38**, 321-331 (1987)
 - 8 THEWS G., MUTSCHLER E., VAUPEL P.
Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1989, S. 606
 - 9 BADEN H.P., LEE, L.D.
Fibrous Protein of Human Epidermis, J. Invest. Dermatol. **71**, 148-151 (1978)
 - 10 BERNSTEIN I.A.
In: Goldsmith, L.A. (Herausgeber), Biochemistry and Physiology of the Skin, Oxford University Press 1983, SS. 170-183
 - 11 BERNSTEIN I.A.
In: Goldsmith, L.A. (Herausgeber), Biochemistry and Physiology of the Skin, Oxford University Press 1983, SS. 184-196
 - 12 RICE R.H., GREEN H.
The Cornified Envelope of Terminally Differentiated Human Epidermal Keratinocytes Consists of Cross-Linked Protein, Cell **11**, 417-422 (1977)

-
- 13 ODLAND G.F., HOLBROOK K.A.
In: Mali, J.W.H. (Herausgeber), Current Problems in Dermatology, Karger Basel (1981), SS. 29-49
 - 14 GRAY G.M., YARDLEY H.J.
Different populations of pig epidermal cells: isolation and lipid composition, J. Lipid Res. **16**, 441-447 (1975)
 - 15 GRAY G.M., WHITE R.J.
Glycosphingolipids and Ceramides in Human and Pig Epidermis, J. Invest. Dermatol. **70**, 336-341 (1978)
 - 16 WERTZ P.W.
In: Bereiter-Hahn J., Matoltsy A.G., Richards K.S. (Herausgeber), Biology of the Integument. Vol.2, Springer Verlag Berlin 1986, SS. 815-823
 - 17 YARDLEY, H.J.
In: Goldsmith L.A. (Herausgeber), Biochemistry and Physiology of the Skin, Oxford University Press 1983, SS. 363-381
 - 18 WEINSTEIN G.D., FROST P., HSIA S.L.
In vitro interconversion of Estrone and 17 β -Estradiol in human skin and vaginal mucosa, J. Invest. Dermatol. **51**, 4-10 (1968)
 - 19 MARTIN R.J., DENYER S.P., HADGRAFT J.
Skin metabolism of topically applied compounds, Int. J. Pharm. **39**, 23-32 (1987)
 - 20 BARRY B.W.
Mode of action of penetration enhancers in human skin, J. Controlled Release **6**, 85-97 (1987)
 - 21 BLANK I.H., SCHEUPLEIN R.J.
Transport into and within the skin, Br. J. Dermatol. **81**, Suppl. 4, 4-10 (1969)
 - 22 BAUER K.H., FRÖMMING K.H., FÜHRER C.
Pharmazeutische Technologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1993, S. 194
 - 23 HOLBROOK K.A., ODLAND G.F.
Regional differences in the thickness (cell layers) of the human stratum corneum: an ultrastructural analysis, J. Invest. Dermatol. **62**, 415-422 (1974)
 - 24 ANDERSON R.L., CASSIDY J.M.
Variations in physical dimensions and chemical composition of human stratum corneum, J. Invest. Dermatol. **61**, 30-32 (1973)
 - 25 ROOK A., WILKINSON D.S., EBLING F.J.G., CHAMPION R.H., BURTON J.L.
Textbook of Dermatology Vol.1, Blackwell Scientific Publications London Edinburgh Boston (1992), SS. 49-50
 - 26 NEUBERT R., SCHMALFUß U., WOHLRAB W., HUSCHKA CH.
Wirkstoffpenetration in die Haut und deren Modulation, Pharm. Ztg. **141**, 1483-1493 (1996)

-
- 27 ZIEGENMEYER J.
Haut – Vehikel – Pharmakon, die entscheidenden Kriterien für die percutane Absorption, Pharm. unserer Zeit **15**, 129-143 (1986)
 - 28 DOWNING D.T., WERTZ P.W., STEWART M.E.
The role of sebum and epidermal lipids in the cosmetic properties of skin, Int. J. Cosmet. Sci. **8**, 115-123 (1986)
 - 29 WESTER R.C., MAIBACH H.J.
Cutaneous Pharmacokinetics: 10 Steps to Percutaneous Absorption, Drug Metab. Rev. **14**, 169-205 (1983)
 - 30 LIPPOLD B.C.
Wirkstoffresorption aus Dermatika, Dtsch. Apoth. Ztg. **121**, 2585ff (1981)
 - 31 MALLORY S.B., LEHMAN P.A., VANDERPOOL D.R., FRANZ T.J.
Pediatr. Dermatol. **10**, 370 (1993) zit. [35]
 - 32 HADGRAFT J., WILLIAMS D.G., ALLAH G.
In: Walters K.A., Hadgraft J. (Herausgeber), Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement, Marcel Dekker, New York, Basel 1993
 - 33 SANTUS G.C., BAKER R.W.
Transdermal enhancer patent literature, J. Control. Rel. **25**, (1993) zit. [35]
 - 34 KIM C.K., KIM J.J., CHI S.-C., SHIM C.-K.
Effect of fatty acids and urea on the penetration of ketoprofen through rat skin, Int. J. Pharm. **99**, 109 (1993)
 - 35 KALBITZ J., NEUBERT R., WOHLRAB W.
Modulation of skin drug penetration, Parmazie **51**, 619-637 (1996)
 - 36 FALSON-RIEG F., LAFFORGUE C.
Prediction of percutaneous penetration, **4a**, Ch. 40 (1995) zit. [35]
 - 37 SHAH V.P., ELKINS J., LAM S.-Y., SKELLY J.P.
Determination of in vitro drug release from hydrocortisone creams, Int. J. Pharm. **53**, 53-59 (1988)
 - 38 KUNDU S.C., CAMERON A.D., MELTZER N.M., QUICK T.W.
Development and validation of method for determination of in vitro release of retinoic acid from creams, Drug Dev. Ind. Pharm., **19**, 425-438 (1993)
 - 39 KEYHANI-MORRISON E., NADKARNI S., SAKR A.
Optimization of an in vitro method for evaluating the release of a novel retinoid from topical gels, Pharm. Ind. **57**, 414-419 (1995)
 - 40 LOTH H., HOLLA-BENNINGER A.
Untersuchungen der Arzneistoffliberation aus Salben, Pharm. Ind. **40**, 256-261 (1978)

-
- 41 FRANZ T.J.
Percutaneous absorption – Relevance of in vitro data, *J. Invest. Dermatol.* **64**, 190-195 (1975)
 - 42 SHAH V.P., FLYNN G.L., GUY R.H., MAIBACH H.I., SCHAEFER H., SKELLY J.P., WESTER R. C., YACOBI A.
In vivo percutaneous penetration / absorption, *Int. J. Pharm.* **74**, 1-8 (1991)
 - 43 DUCHÊNE D.
Cyclodextrins and their industrial uses, Editions de Santé Paris, 1987, SS. 447-460
 - 44 GERLOCZY A., ANTAL S., SZEJTLI J.
In: Huber O. (Herausgeber), Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins: Munich, West Germany, April 20-22, 1988, SS. 415-422, zit. [151]
 - 45 ARIMA H., ADACHI H., IRIE T., UEKAMA K., PITHA J.
Enhancement of the Antiinflammatory Effect of Ethyl 4-Biphenyl Acetate in Ointment by β -Cyclodextrin Derivates: Increased Absorption and Localized Activation of the Prodrug in Rats, *Pharm. Res.* **7**, 1152-1156 (1990)
 - 46 OKAMOTO H., KOMATSU H., HASHIDA M., SEZAKI H.
Effects of β -Cyclodextrin and di-O-methyl- β -cyclodextrin on the percutaneous absorption of butylparaben, indomethacin and sulfanilic acid, *Int. J. Pharm.* **30**, 35-45 (1986)
 - 47 VOLLMER U., MÜLLER B.W., PEETERS J., MESENS J., WILFFERT B., PETERS T.
A Study of the percutaneous absorption-enhancing effects of cyclodextrin derivatives in rats, *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 19-22 (1994)
 - 48 IRIE T., OTAGIRI M., SUNADA M., UEKAMA K., OHTANI Y., YAMADA Y., SUGIYAMA Y.
Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes of human erythrocytes in vitro, *J. Pharm. Dyn.* **5**, 741-744 (1982)
 - 49 FRIDRICH R., MEHNERT W., FRÖMMING K.-H.
Studies of the Inclusion compound between β -Cyclodextrin and Cholesterol, In: Hedges A.R. (Herausgeber), Minutes of the Fifth International Symposium on Cyclodextrins: Chicago, 21 to 24 April 1992, Edition de Santé Paris 1992, SS. 299-302
 - 50 ARIMORI K., SAKAI A., OTAGIRI M., UEKAMA K.
Improvement in biopharmaceutics of prednisolone by β - and γ -cyclodextrins, *J. Inclusion Phenom.* **1**, 387-394 (1984)
 - 51 UEKAMA K., ARIMORI K., SAKAI A., MASAKI K., IRIE T., OTAGIRI M.
Improvement in percutaneous absorption of prednisolone by β - and γ -cyclodextrin complexations, *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 2910-2913 (1987)
 - 52 UEKAMA K., OTAGIRI M., SAKAI A., IRIE T., MATSUO N., MATSUOKA Y.
Improvement in the percutaneous absorption of beclomethasone dipropionate by γ -Cyclodextrin complexation, *J. Pharm. Pharmacol.* **37**, 532-535 (1985)

-
- 53 PREISS A., MEHNERT W., FRÖMMING K.-H.
Penetration of hydrocortisone into excised human skin under the influence of cyclodextrins, *Pharmazie* **50**, 121ff (1995)
- 54 OTAGIRI M., FUJINAGA T., SAKAI A., UEKAMA K.
Effects of β - and γ -cyclodextrins on release of betamethasone from ointment bases, *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 2401-2405 (1984)
- 55 FRIJLINK H.W., EISSENS A.C., SCHOONEN A.J.M., LERK C.F.
The Effects of Cyclodextrins on Drug Release from Fatty Suppository Bases / I. In vitro Observations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **37**, 178-182 (1991)
- 56 FRIJLINK H.W., EISSENS A.C., SCHOONEN A.J.M., LERK C.F.
The Effects of Cyclodextrins on Drug Release from Fatty Suppository Bases / II. In vivo Observations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **37**, 183-187 (1991)
- 57 FRIJLINK H.W., PAIOTTI S., EISSENS A.C., LERK C.F.
The Effects of Cyclodextrins on Drug Release from Fatty Suppository Bases / III. Application of Cyclodextrin Derivatives, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **38**, 174-179 (1992)
- 58 IRIE T., UEKAMA K.
Protection against the photosensitized skin irritancy of chlorpromazine by cyclodextrin complexation, *J. Pharmacobio-Dyn.* **8**, 788-791 (1985)
- 59 HOSHINO T., ISHIDA K., IRIE T., UEKAMA K., ONO T.
An attempt to reduce the photosensitizing potential of chlorpromazine with the simultaneous use of β - and dimethyl- β -cyclodextrins in guinea pigs, *Arch. Dermatol. Res.* **281**, 60-65 (1989)
- 60 AMDIDOUCE D., MONTASSIER P., POELMAN M.-C., DUCHÊNE D.
Evaluation by laser Doppler velocimetry of the attenuation of tretinoin induced skin irritation by β -cyclodextrin complexation, *Int. J. Pharm.* **111**, 111-116 (1994)
- 61 ARIMA H.; KONDO T., IRIE T., UEKAMA K.
Enhanced rectal absorption and reduced local irritation of the anti-inflammatory drug Ethyl-4-biphenylacetate in rats by complexation with water-soluble β -cyclodextrin derivatives and formulation as oleaginous suppository, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 1119-1125 (1992)
- 62 AMDIDOUCE D., DARROUZET H., DUCHÊNE D., POELMAN M.-C.
Inclusion of retinoic acid in β -cyclodextrin, *Int. J. Pharm.* **54**, 175-179 (1989)
- 63 ROLLAND A., SHROOT B.
Preparation and evaluation of dermatological formulations based on the inclusion of tretinoin in β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin
In: Hedges A.R. (Herausgeber), Minutes of the Fifth International Symposium on Cyclodextrins: Chicago, 21 to 24 April 1992, Edition de Santé Paris 1992, SS. 529-534

-
- 64 IRIE T, UEKAMA K.
Pharmaceutical Applications of cyclodextrines-toxicological issues and safety evaluation, *J. Pharm. Sci.*, **86**, 147-162 (1997)
- 65 IRIE T., SUNADA M., OTAGIRI M., UEKAMA K.
Protective mechanism of β -cyclodextrin for the hemolysis induced with phenothiazine neuroleptics in vitro, *J. Pharm. Dyn.* **6**, 408-414 (1983)
- 66 UEKAMA K., IRIE T., OTAGIRI M., HOSHINO T., YAMADA Y., OHTANI Y.
Protective effects of cyclodextrins on the hemolysis induced with imipramine in vitro, *Maku* **8**, 315-321 (1983)
- 67 MENTER A., BARKER J.N.W.N.
Psoriasis in practice, *Lancet* **338**, 231-234 (1991)
- 68 STADLER R., OTTE H.-G.
Eine neue Alternative in der Psoriasis-Therapie: Calcipotriol, ein Vitamin-D₃-Analogon. Zwei Fallberichte, *Haut und Gesundheit*, Band **68**, 292-295 (1993)
- 69 VAN DE KERKHOF P.C.M.
Biological activity of vitamin D analogues in the skin, with special reference to antipsoriatic mechanisms, *Br. J. Dermatol.* **132**, 675-682 (1995)
- 70 THIEROFF-ECKERDT R., GERHARD D., HARTUNG A., KRAUSE A., WIESINGER, H.
Erythema induction by calcipotriol: a vitamin D receptor-mediated effect? *Arch. Dermatol. Res.* **286**, 159 (1994)
- 71 KRAGBALLE K., WILDFANG I.L.
Calcipotriol (MC 903), a novel vitamin D₃ analogue stimulates terminal differentiation and inhibits proliferation of cultured human keratinocytes, *Arch. Dermatol. Res.* **282**, 164-167 (1990)
- 72 MUTSCHLER E., SCHÄFER-KORTING M.
Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1996, S. 622
- 73 KRAGBALLE K.
Treatment of psoriasis by the topical application of the novel cholecalciferol analog calcipotriol, *Arch. Dermatol. Res.* **125**, 1647-1652 (1989)
- 74 BINDERUP L., BRAMM E.
Effects of a novel vitamin D analogue MC 903 on cell proliferation and differentiation in vitro and on calcium metabolism in vivo, *Biochem. Pharmacol.* **37**, 889-895 (1988)
- 75 SZEJTLI J., BOLLA-PUSZTEI É., SZABÓ P., FERENCZY T.
Enhancement of stability and biological effect of cholecalciferol by β -cyclodextrin complexation, *Pharmazie* **35**, 779-787 (1980)
- 76 SZEJTLI J., DAVIES J.E.D.
Cyclodextrin Technology, Kluwer Academic Publishers Dordrecht Boston London 1988, S. 83

-
- 77 OKADA Y., KUBOTA Y., KOIZUMI K., HIZUKURI S., OHFUJI T., OGATA K.
Some properties and the inclusion behavior of branched cyclodextrins, *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 2176-2185 (1988)
- 78 PITHA J., MILECKI J., FALES H., PANNELL L., UEKAMA K.
Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs, *Int. J. Pharm.* **29**, 73-82 (1986)
- 79 LOFTSSON T., ÓLAFSDÓTTIR B.J., FRIDRIKSDÓTTIR H.
Comparative study on inclusion complexation of acetylsalicylic acid, cholecalciferol and melphalan with β - and γ -cyclodextrin and some of their derivatives, *Acta Pharm. Nord.* **2**, 303ff (1990)
- 80 HARIA M., BALFOR J.A.
Methylprednisolone aceponate: A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the topical treatment of eczema, *Clin. Immunother.* **3**, 241-253 (1995)
- 81 SCHUNACK W., MAYER K., HAAKE M.
Arzneistoffe: Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, Vieweg Braunschweig 1983, S. 437
- 82 KARLSON P.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1988, S. 378
- 83 BUDDECKE E.
Grundriss der Biochemie, Walter de Gruyter Berlin 1985, S. 418
- 84 SMITH E.L., PINCUS S.H., DONOVAN L., HOLICK M.F.
A novel approach for the evaluation and treatment of psoriasis, *J. Am. Acad. Dermatol.* **19**, 516-528 (1988)
- 85 MURDOCH D., CLISSOLD S.P.
Calcipotriol: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Psoriasis Vulgaris, *Drugs* **43**, 415-429 (1992)
- 86 WOZEL G., BARTH J.
Vergleichende Untersuchungen über die Wirksamkeit topischer Steroide bei Psoriasis, *Dermatol. Monatsschr.* **172**, 550-553 (1986)
- 87 CRAMER F.
Einschlußverbindungen, *Angew. Chem.* **64**, 437-447 (1952)
- 88 HIRAYAMA F., UEKAMA K., KOINUMA H.
Molecular dynamics of prostaglandin $F_{2\alpha}$ -cyclodextrin complexes in aqueous solution, *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 1975-1980 (1980)

-
- 89 SCHURIG V., NOWOTNY H.-P.
Angew. Chem., **102**, 969 (1990)
 - 90 BETZEL C., SAENGER W., HINGERTY B.E., BROWN G.M.
Circular and flip-flop hydrogen bonding in β -cyclodextrin undecahydrate: A neutron diffraction study, J. Am. Chem. Soc. **106**, 7545-7557 (1984)
 - 91 UEKAMA K.
Cyclodextrin derivatives as drug carriers, Pharm. Tech. Jpn. **4**(2), 183-189 (1988)
 - 92 BREWSTER M.E., SIMPKINS J.W., HORA M.S., STERN W.C., BODOR N.
The potential use of cyclodextrins in parenteral formulations, J. Parent. Sci. Technol. **43**, 231-240 (1989)
 - 93 YAMAMOTO M., YOSHIDA A., HIRAYAMA F., UEKAMA K.
Some physicochemical properties of branched β -cyclodextrins and their inclusion characteristics, Int. J. Pharm. **49**, 163-171 (1989)
 - 94 HIRAYAMA F., HIRASHIMA N., ABE K., UEKAMA K., IJITSU T., UENO M.
Utilization of diethyl- β -cyclodextrin as a sustained-release carrier for isosorbide dinitrate, J. Pharm. Sci. **77**, 233-236 (1988)
 - 95 UEKAMA K., HORIUCHI Y., IRIE T., HIRAYAMA F.
O-Carboxymethyl-O-ethylcyclomaltoheptaose as a delayed-release-type drug carrier: Improvement of the oral bioavailability of diltiazem in the dog, Carbohydr. Res. **192**, 323-330 (1989)
 - 96 ADACHI H., IRIE T., HIRAYAMA F., UEKAMA K.
Stabilization of Prostaglandin E₁ in fatty alcohol propylene glycol ointment by acidic cyclodextrin derivative, O-Carboxymethyl-O-ethyl- β -cyclodextrin, Chem. Pharm. Bull. **40**, 1586-1591 (1992)
 - 97 SZEJTLI V.J., FENYVESI E., ZSADON B.
Cyclodextrinpolymere, Stärke **30**, 127-131 (1978)
 - 98 UEKAMA K., OTAGIRI M., IRIE T., SEO H., TSURUOKA N.
Improvement of dissolution and absorption characteristics of phenytoin by a water-soluble β -cyclodextrin-epichlorhydrin polymer, Int. J. Pharm. **23**, 35-42 (1985)
 - 99 SZEJTLI J.
Complexing properties of substituted cyclodextrins and cyclodextrin polymers in aqueous solutions, Carbohydrate Polymers **2**, 305-306 (1982)
 - 100 DUCHÉNE D., WOUESSIDJEWE D.
Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives, Drug Dev. Ind. Pharm. **16**, 2487-2499 (1990)
 - 101 HIRAYAMA F., UEKAMA K.
Methods of investigating and preparing inclusion compounds
In: DUCHÉNE D. (Herausgeber), Cyclodextrins and their industrial uses, Editions de Santé Paris 1987, SS. 131-172

-
- 102 MARQUES H.M.C.
Preparation of complexes. Evidence for complex formation.
Rev. Port. Farm. **44**, 157-163 (1994)
- 103 SERPELLONI M., MENTIK L.
Industrial preparation methods of beta-cyclodextrin compounds, In: Hedges A.R. (Herausgeber), Minutes of the Sixth International Symposium on Cyclodextrins, Edition de Santé Paris 1992, SS. 288-293
- 104 JONES S.P., GRANT D.J.W., HADGRAFT J., PARR G.D.
Cyclodextrins in the Pharmaceutical Sciences / Part I: Preparation, Structure and Properties of Cyclodextrins and Cyclodextrin Inclusion Compounds, Acta Pharm. Technol. **30**, 213-223 (1984)
- 105 SAENGER W.
Cyclodextrin-Einschlußverbindungen in Forschung und Industrie, Angew. Chem. **92**, 343-361 (1980)
- 106 TOKUMURA T., UEDA H., TSUSHIMA Y., KASAI M., KAYANO M., AMADA I., NAGAI T.
Inclusion complexes of cinnarizine with β -Cyclodextrin in aqueous solution and in the Solid State, Chem. Pharm. Bull. **32**, 4179-4184 (1984)
- 107 DEMARCO P.V., THAKKAR A.L.
Cyclohepta-amylose inclusion complexes. A proton magnetic resonance study, J. Chem. Soc. Chem. Commun., S.2ff (1970)
- 108 SZEJTLI J.
Cyclodextrines and their inclusion complexes, Akademiai Kiado Budapest 1982, SS. 162-180
- 109 UEKAMA K., SAKAI A., ARIMORI K., OTAGIRI M., SAITO H.
Different mode of prednisolone within α -, β - and γ -cyclodextrins in aqueous solution and in solid state, Pharm. Acta Helv. **60**, 117-122 (1985)
- 110 LIU F.-Y., KILDSIG D.O., MITRA A.K.
Beta-cyclodextrin/steroid complexation: Effect of steroid structure on association equilibria, Pharm. Res. **7**, 869-874 (1990)
- 111 OTAGIRI M., IMAI T., HIRAYAMA F., UEKAMA K., YAMASAKI M.
Inclusion complex formations of the antiinflammatory drug flurbiprofen with cyclodextrins in aqueous solution and in solid state, Acta Pharm. Suec. **20**, 11-20 (1983)
- 112 DIN 51005
Thermische Analyse (TA): Begriffe, Beuth Verlag, Ausgabe 08/1993, 6 Seiten
- 113 WIDMANN G., RIESEN R.
Thermoanalyse, Hüthig Verlag Heidelberg 1987, S. 16
- 114 HIGUCHI T., CONNERS K.A.
Phase-solubility techniques, Adv. Anal. Chem. Instr. **4**, 117-212 (1965)

-
- 115 MANOR P.C., SAENGER W.
Topography of Cyclodextrin Inclusion Complexes / III. Crystal and Molecular Structure of Cyclohexaamylose Hexahydrate, the (H₂O)₂ Inclusion Complex, J. Am. Chem. Soc. **96**, 3630ff (1974)
- 116 NAKAI Y, YAMAMOTO K., TERADA K., AKIMOTO K.
The dispersed states of medicinal molecules in ground mixtures with α - or β -cyclodextrin, Chem. Pharm. Bull. **32**, 685-691 (1984)
- 117 UEDA H., NAGAI T.
Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy and raman spectroscopy of the inclusion compound of tolbutamide with β -cyclodextrin, Chem. Pharm. Bull. **29**, 2710-2714 (1981)
- 118 KEIPERT S., FEDDER J., BOHM A., HANKE B.
Interactions between cyclodextrins and pilocarpine – as an example of a hydrophilic drug, Int. J. Pharm., **142**, 153-162 (1996)
- 119 MOYANO J.R., ARIAS M.J., GINES J.M., RABASCO A.M.
Dissolution behavior of oxazepam in presence of cyclodextrins – evaluation of oxazepam-dimeb binary system, Drug Dev. Ind. Pharm., **23**, 379-385 (1997)
- 120 BRONAUGH R.L.
Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques
In: Bronaugh R.L. and Maibach H.I. (Herausgeber), Percutaneous Absorption. Mechanisms-Methodology-Drug Delivery. Marcel Dekker, New York 1989, SS. 239-258
- 121 BABAR A., BHANDARI R.D., PLAKOGIANNIS F.M.
In vitro release studies of chlorpheniramine maleate from topical bases using cellulose membrane and hairless mouse skin
Drug Dev. Ind. Pharm. **17**, 1027-1040 (1991)
- 122 HADGRAFT J.W., WALTERS K.A., WOTTON P.K.
Facilitated percutaneous absorption: a comparison and evaluation of two in vitro models, Int. J. Pharm. **32**, 257-263 (1986)
- 123 RICHTER B.
Biopharmazeutische in vitro Untersuchungen zum Stofftransport durch künstliche Membranen, Dissertation der Humboldt Universität zu Berlin 1988
- 124 HIGUCHI W.J.
Diffusional models useful in biopharmaceutics / drug release rate processes, J. Pharm. Sci. **56**, 315-324 (1967)
- 125 HIGUCHI T.
Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments, J. Soc. Cosmet. Chem. **11**, 85-93 (1960)
- 126 NIEDNER R., ZIEGENMEYER J.
Dermatika, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1992, SS. 288-290

-
- 127 LOTH H., HAILER M.
Parameter-Bestimmung bei der Arzneistoffliberation aus Salben in Membranmodellen, *Acta Pharm. Technol.*, **29**, 97-102 (1983)
- 128 LIPPOLD B.C.
Kutane Resorption – Möglichkeiten, Modelle, Beeinflussung, *Acta Pharm. Technol.* **27**, 1-5 (1981)
- 129 YALKOWSKI S.H., FLYNN G.L.
Correlation and prediction of mass transport across membranes II: Influence of vehicle polarity on flux from solutions and suspensions, *J. Pharm. Sci.* **63**, 1276-1285 (1974)
- 130 WILD T.
Einfluß der physiko-chemischen Eigenschaften von Arzneistoffen und Vehikeln auf die Permeabilität der menschlichen Hornschicht, Dissertation, Universität Saarbrücken 1988
- 131 US PHARMACOPEIA USP 23 NF 18 1995
Transdermal Delivery Systems - General Drug Release Standards, Dissolution <724>, S. 1791
- 132 SWR 37 Steuerungs- und Auswertungssoftware Rheologie, Mettler Toledo, 1993
- 133 SUCKER W., SPEISER H., FUCHS H.
Pharmazeutische Technologie, Stuttgart Thieme, 1991, SS. 2-3
- 134 FRANKE P., HOFFMANN K., TÄUBER U., KEIPERT S.
In-vitro-Liberationsstudien aus Steroidsalben, *Pharm. Ind.* **58**, 1152-1156 (1996)
- 135 GRID
Software Version 11, Molecular Discovery Ltd., Oxford, England
- 136 GOODFORD P.J.
A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules, *J. Med. Chem.* **28**, 849-855 (1985)
- 137 ANZALI S.
Molecular Modelling-Studien zum Herzglykosid-Rezeptorareal an der Na⁺-ATPase, Dissertation, Freie Universität Berlin (1993)
- 138 CRUCIANI G., WATSON K.A.
Comparative Molecular Field Analysis Using GRID Force-Field and GOLPE Variable Selection Methods in a Study of Inhibitors of Glycogen Phosphorylase b, *J. Med. Chem.* **37**, 2589-2601 (1994)
- 139 JENDRETZKY U.
Molecular-Modelling-Untersuchungen zum Bindungsverhältnis von 5-HT_{2α}-rezeptor-affinen Substanzen, Dissertation, Freie Universität Berlin (1993)
- 140 UEKAMA K., OTAGIRI M.
Cyclodextrins in drug carrier systems, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **3**, 1-40 (1987)

-
- 141 KIKUCHI M., HIRAYAMA F., UEKAMA K.
Improvement of oral and rectal bioavailabilities of carmofur by methylated β -cyclodextrin complexations, *Int. J. Pharm.* **38**, 191-198 (1987)
- 142 CASU B., REGGIANI M.
Methylated cycloamyloses (cyclodextrins) and their inclusion properties, *Carbohydr. Res.* **76**, 59-66 (1979)
- 143 BRAUNS U., MÜLLER B.W.
 β -Cyclodextrin inclusion compounds for pharmaceuticals, Patent von Janssen Pharmaceutica N. V., DE 3346123 A1 850627 (1983)
- 144 OKADA Y., TACHIBANA M., KOIZUMI K.
Solubilization of lipid-soluble vitamins by complexation with glucosyl- β -cyclodextrin, *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 2047-2049 (1990)
- 145 GLOMOT F., BENKERROUR L., DUCHÊNE D., POELMAN M.-C.
Improvement in availability and stability of a dermocorticoid by inclusion in β -cyclodextrin, *Int. J. Pharm.* **46**, 49-55 (1988)
- 146 SHANKLAND N., PEARSON A., JOHNSON J.R., SALOLE E.G.
The influence of β -cyclodextrin on the release of hydrocortisone from a topical cream base, *J. Pharm. Pharmacol.* **37** Supp, 107-114 (1985)
- 147 ASCHE H., ESSIG D., SCHMIDT P.C.
Technologie von Salben, Suspensionen und Emulsionen (ein Seminar der APV, Darmstadt, Sept. 1982), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1984, S. 174
- 148 FUNK O., SCHWABE L., FRÖMMING K.-H.
Freeze-dried preparations of ketoprofen and heptakis-(2,6-O-dimethyl)- β -cyclodextrin, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **20**, 1957-1969 (1994)
- 149 BARRY B.W.
Dermatological Formulations, Percutaneous Resorption, Marcel Dekker Inc. New York 1983, S. 73
- 150 ORIENTI I., ZECCHI V., BERTASI V., FINI A.
Release of ketoprofen from dermal bases in presence of cyclodextrins: effect of the affinity constant determined in semisolid vehicles, *Arch. Pharm.* **324**, 943-947 (1991)
- 151 FRÖMMING K.-H., MEHNERT W., BADY P., KRAUS C., STEIN M., WEDELICH V.
Competitive reactions of cyclodextrin inclusion compounds, In: Duchêne D. (Herausgeber), *Minutes International Symposium Cyclodextrins*, 5th (1990), Edition Santé Paris 1990, SS. 392-398
- 152 SZETLI J., BÁNKYELÖD E.
Inclusion complexes of unsaturated fatty-acids with amylose and cyclodextrin, *Stärke* **27**, 368-376 (1975)

-
- 153 OKADA Y., KOIZUMI K., OGATA K., OHFUJI T.
Inclusion Complexes of Lipids with Branched Cyclodextrins, *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 3096-3099 (1989)
- 154 PREISS A.
Beeinflussung der Arzneistofffreisetzung aus Salben und der Penetration in Humanhaut durch Cyclodextrine, Dissertation, Freie Universität Berlin 1993
- 155 Couarraze G., Wepierre J.
Topical applications of liposomes, In: Puisieux F., Couvreur P., Delattre J., Devissaguet J.-P. (Herausgeber), *Liposomes, New systems and new trends in their applications*, Editions de Santé Paris 1995, SS. 615-635
- 156 HELENIUS A., SIMONS K.
Solubilization of membranes by detergents, *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 29-79 (1975)
- 157 WOHLRAB W., LASCH J., TAUBE K.-M., WOZNIAK K.-D.
Hautpermeation von liposomal inkorporiertem Hydrocortison, *Pharmazie* **44**, 333ff (1989)
- 158 MEZEI M., GULASEKHARAM V.
Liposomes – a selective drug delivery system for the topical route of administration, *Life Sci.* **26**, 1473-1477 (1980)
- 159 LASIC D.D.
Liposomes: from Physics to Application, Elsevier Amsterdam 1993, Ch. 4, SS.109ff
- 160 KIRKHUS B., OLSEN W.M., CLAUSEN O.P.F.
A comparison between the epidermal regenerative responses provoked by a skin irritant and a tumor promoter using anti-BrdUrd/DNA flow cytometry, *Carcinogenesis* **12**, 833-837 (1991)
- 161 LINDBERG M., FORSLIND B., SAGSTRÖM S., ROOMANS G.M.
Elemental changes in guinea pig epidermis at repeated exposure to sodium lauryl sulfate, *Acta Derm. Venereol.* **72**, 428-431 (1992)
- 162 HAIGH J.M., SMITH E.W.
The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2**, 311-330 (1994)
- 163 BRONAUGH R.L., STEWART R.F., CONGDON E.R.
Methods for in vitro percutaneous absorption studies / II. Animal models for human skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **62**, 481-488 (1982)
- 164 SZEJTLI J., BOLLA K, NAGY G.
UK Patent Applicaton GB 2037773 A 1989
- 165 GELDER T.
Herstellung und Charakterisierung der Einschlußverbindungen von β -Cyclodextrinen und Dimeb mit Vitamin A Acetat, Dissertation, Freie Universität Berlin 1988

- 166 VENTURA C.A., PUGLISI G., GIAMMONA G., BOTTINO F.A.
Comparative study on inclusion compounds of 4-biphenylacetic acid with β -cyclodextrin, hydroxypropylated- β -cyclodextrins, and methylated- β -cyclodextrins, Drug Dev. Ind. Pharm. **20**, 2245-2265 (1994)
- 167 KOIZUMI K., OKADA Y., KUBOTA Y., UTAMURA T.
Inclusion complexes of poorly water-soluble drugs with glucosyl-cyclodextrins, Chem. Pharm. Bull. **35**, 3413-3418 (1987)
- 168 SACHS, L.
Statistische Methoden, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1982, SS. 44-58

Lebenslauf

Name:	Patrick Oliver Franke
Geburtsdatum:	25. Dezember 1967
Geburtsort:	Berlin-Moabit
1974 - 1977	Besuch der St. Paulus-Grundschule, Berlin-Moabit
1977 - 1980	Besuch der Ikarus-Grundschule, Berlin-Tempelhof
1980 - 1987	Besuch der Askanische Oberschule, Berlin-Tempelhof
Juni 1987:	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
Okt. 1987 - Feb. 1988	Praktikantentätigkeit bei der Auergesellschaft, Bereich Qualitätskontrolle, Berlin-Neukölln
SS 1988 bis SS 1992	Studium der Pharmazie am Fachbereich der Freien Universität Berlin
September 1990	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1992	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Nov. 1992 - April 1993	Pharmaziepraktikum bei der Schering AG Berlin, Endfertigungsbetrieb der Salben- und Suppositorienherstellung
Mai 1993 - Okt. 1993	Pharmaziepraktikum in der Gropius-Apotheke, Berlin-Neukölln
November 1993	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dezember 1993	Approbation als Apotheker
Januar 1994	Beginn der Arbeit zu einer Dissertation unter Leitung von Fr. Prof. Dr. Keipert am Institut für Pharmazie an der Humboldt-Universität zu Berlin
April 1994 - Aug. 1996	Teilzeittätigkeit als Apotheker in der Curland Apotheke, Rathenow

seit Sep. 1996	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Dermatologie-Zentrum, Abteilung Pharmazeutische Entwicklung Dermatologie, Schering AG Berlin
----------------	--

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Pharmazeutische Entwicklung Dermatologie der Schering AG Berlin und der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Pharmazie, unter Leitung von Frau Prof. Dr. S. Keipert durchgeführt.

Frau Prof. Dr. S. Keipert danke ich sehr herzlich für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis sowie ihre stets freundliche Unterstützung beim Erstellen der Arbeit.

Meiner Mentorin im Hause Schering, Frau Dr. Karin Hoffmann, danke ich für die jederzeit gewährte freundschaftliche Unterstützung und ihre ständige Bereitschaft zur konstruktiven Diskussion während der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch der Leiterin der Pharmazeutischen Entwicklung Dermatologie, Frau Dr. Jutta Riedl, für die Aufnahme in ihre Abteilung und die jederzeit gewährte materielle und moralische Unterstützung.

Herrn Dr. Wiesinger, Abteilung Experimentelle Dermatologie, Schering AG Berlin, danke ich für die Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen.

Herrn Dr. Beier, Freie Universität Berlin, danke ich für die Unterstützung bei Durchführung der Molecular Modelling Untersuchungen.

Herrn Schiller, Abteilung Pharma Labor, Schering AG Berlin danke für die Möglichkeit, DSC-Messungen durchführen zu können.

Für die Durchführungen der NMR-Messungen danke ich Herrn Dr. Michl, Abteilung Struktur- und Spurenanalyse, Schering AG Berlin.

Frau D. Zorychta und Herrn I. Heinrich danke ich für die herzliche Arbeitsatmosphäre im Labor.

Der Schering AG danke ich für das Stipendium und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Meiner Frau Stefanie danke ich für die kritische Durchsicht des Dokumentes und vor allem ihrem emotionalen Beistand.